

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Estudio e interés biotecnológico de una esterasa versátil producida por
un hongo del azulado de la madera**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Barba Cedillo

Director
Roberto Munilla Morán

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**ESTUDIO E INTERÉS BIOTECNOLÓGICO DE UNA
ESTERASA VERSÁTIL PRODUCIDA POR UN
HONGO DEL AZULADO DE LA MADERA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Víctor Barba Cedillo

Bajo la dirección del doctor

Roberto Munilla Morán

Madrid, 2015

ESTUDIO E INTERÉS BIOTECNOLÓGICO DE UNA ESTERASA VERSÁTIL PRODUCIDA POR UN HONGO DEL AZULADO DE LA MADERA

MEMORIA

para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid
presentada por:

VÍCTOR BARBA CEDILLO

DIRECTOR:

Dr. Roberto Munilla Morán

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid



MADRID, 2015



ROBERTO MUNILLA MORÁN, DR. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo *“Estudio e interés biotecnológico de una esterasa versátil producida por un hongo del azulado de la madera”*, constituye la memoria que presenta el Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, Víctor Barba Cedillo, para optar al grado de Doctor y ha sido realizado en el Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 14 de octubre de 2015.

Roberto Munilla Morán

*A mis padres,
A mi hermano y a mi hermana,
A mi hermana política y a mi pequeña sobrina,
A mis abuelos.*

“... So close no matter how far, couldn't be much more from the heart, forever trusting who we are, and nothing else matters. Never cared for what they do, never cared for what they know, but I know...”

Metallica

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se ha realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, y durante varias estancias predoctorales en el departamento de Ingeniería Química de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona, en el grupo de Biocatálisis del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC en Madrid y en el grupo de Cristalografía del Instituto Rocasolano del CSIC en Madrid. La financiación se ha obtenido de una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia (AP-2004-5867) y varios contratos predoctorales del CSIC.

Después de mucho tiempo ha llegado el momento de mostrar mi agradecimiento a todas las personas que se han visto involucradas directa o indirectamente en la realización de esta tesis. El camino no ha sido fácil pero me siento satisfecho de haber logrado un buen final. No la había terminado cuando ya pensaba en cómo redactaría esta parte, no menos importante, de este manuscrito. Hoy, un día de noviembre de 2015, me siento frente al ordenador y sereno trato de plasmar mi gratitud.

Me gustaría comenzar agradeciéndole a la Dra. Covadonga Vázquez del departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM la oportunidad que me dio de trabajar durante mi último año de carrera en su laboratorio; allí coincidiría con los que luego serían, de nuevo, compañeros míos en el CIB: Amaia y Miguel, gracias por enseñarme una buena parte de lo que sé sobre PCR's y micotoxinas.

Al Dr. Juan Carlos Gutiérrez de aquél departamento por su ayuda con los trámites burocráticos.

Agradezco a las Dras. María Jesús Martínez y Alicia Prieto del CIB la confianza depositada en mi durante todos estos años y por creer en mi trabajo y valorarlo tan positivamente.

A todos los que habéis sido compañeros míos en el CIB: Bea, M^a José, Elvira, Quique, Isabel Vallés, María, Javi, Susana, Mariela, Ana, Eva, Aitor, Ángeles, Craig, Yuta, Davinia, M^a Eugenia, Vero, Elena, Isabel Vicente, Isabel Pardo, Jesús y Jorge; y a todos los que pasaron por el laboratorio: Rosario, Hanem, Houda, Deborah, Roberto... Ya sé que no era un asiduo al café pero he podido disfrutar de vuestra compañía en los momentos precisos.

A mis actuales compañeras en el Servicio de Cultivos de Células animales del CIB, Carmen y Zahira. Gracias por haberme acogido tan bien. Por hacerme llevadero el trabajo, por vuestra diplomacia, por vuestra simpatía, por compartir conmigo parte de vuestra vida personal e impresiones. De verdad lo agradezco.

*Al Dr. Francisco Plou del ICP por ayudarme con la caracterización cinética de la enzima de *O. piceae* y permitirme plasmar en esta tesis los resultados de la inmovilización en Dilbeads™. A Pamela por su simpatía y por enseñarme y ayudarme a utilizar el pH-stato.*

Al Dr. Francisco Valero de la ETSE de la UAB. Muchas gracias Paco por tu acogida y ayuda durante mi estancia en Barcelona. Fue una oportunidad única para aprender a desenvolverse por mi mismo en todos los aspectos. Me sentí muy bien en tu grupo y me enseñasteis todo lo que sé sobre bioprocesos. De tu grupo quiero agradecerle su apoyo especialmente a Carolina sin la cual no hubiese podido llevar a cabo el trabajo que se planteó y quien me ayudó a integrarme en el ambiente del grupo de trabajo; también a David, Ramón y Marina. Gracias a todos.

Al Dr. Juan Hermoso del Instituto Rocasolano por su ayuda con la cristalización de la proteína nativa. No pudo ser, aunque al menos aprendí cómo se trabaja en este campo.

Al que fuera Vicerrector de la UCM, Dr. Joaquín Goyache, y a su equipo del vicerrectorado por su ayuda y mediación durante un momento delicado para el futuro de esta tesis.

Y por fin llegó vuestro turno, y mi reconocimiento y el de toda mi familia, porque sin vosotros no hubiese podido tener la oportunidad de defender la investigación que he realizado durante todos estos años. Que sin conocerme de nada aceptasteis ayudarme para que pudiese terminar con esta etapa. Nunca me cansaré de daros las gracias porque me pongo en vuestro lugar y sé que tampoco ha debido ser fácil esta situación. A vosotros, Dr. José Manuel Guisán y Dr. Roberto Munilla. Muchas gracias de corazón. Muchas gracias por todo. Muchas gracias por vuestros ánimos. Muchas gracias por vuestra ayuda. Muchas gracias por hacerme recuperar la confianza.

A mis compañeros de la Facultad: Lorena, María, Antonio, Ana María, Enrique y Fátima. Sé que no nos vemos mucho por la rutina de nuestras vidas, pero cuando quedamos disfruto de vuestra compañía. Gracias por vuestro apoyo, por vuestra ayuda, por vuestra comprensión y por estar ahí.

A los espartan@s de Carranque, sois un grupo increíble. Porque he tenido la fortuna de conocerlos y el estar con vosotr@s me permite desconectar de mi rutina diaria y a sentirme mucho mejor, por lo bien que lo pasamos dentro y fuera del polideportivo y porque espero muy pronto volver a ser un espartano dominguero. Muchas gracias Sergio por tus conversaciones y Soraya por contagiarnos tu entusiasmo y alegría. Muchas gracias a tod@s y cada un@ de vosotr@s.

A María y a Jerónimo, gracias por vuestra comprensión, ayuda y respeto. Por guiarme para mejorar en mi vida y a preocuparme por lo que realmente es importante, por ayudarme a priorizar.

A los suegros de mi hermano, Pedro y Mari, y a su cuñado Pedrito. Muchas gracias de verdad por vuestro regalo: la fantástica encuadernación artesanal de esta tesis. Sé que tenéis mucho trabajo y habéis tenido que ocupar una buena parte de vuestro tiempo dejando otros encargos para realizarla. Gracias por vuestra simpatía y compañía. Gracias al resto de vuestra familia.

A mi tío Dioni, tía Ana y mis primos. Gracias tío por tenerme en tan alta estima y esperar tanto de mí, por decirme lo mucho que valgo, por animarme, por aconsejarme,...

A mi tío Antonio, mi tía Joaquí y mis primas Sonia e Irene. Muchísimas gracias por vuestra ayuda, por ser mis confidentes, por vuestros ánimos, por ayudarme a salir de mi rutina y hacerme parte de los espartan@s, por vuestros consejos, por cuidarme,...

Al resto de mis tíos, tías, primos y primas. A mi abuela Martina. Agradeceros el estar ahí y haberme cuidado y ayudado.

A mi abuelo Dioni y mi abuela Carmen que desgraciadamente he perdido en duras condiciones a lo largo de la realización de esta tesis. A mi abuelo Víctor, que lo perdí hace más tiempo. Os echo de menos pero sé que de algún modo me habéis ayudado a alcanzar mi objetivo. Nunca os olvidaré. Espero que os sintáis orgullosos de mí. Me hubiese encantado teneros en un día tan especial...

A mis padres, Goyo y Cristina; a mis hermanos Iván, Cristi y Alicia; y a mi pequeña sobrina Carla. Ya sé que os he dejado para lo último, pero eso no quiere decir nada. ¿Qué voy a decir de vosotros? Muchas gracias por todo, por cuidarme, escucharme, comprenderme, ayudarme, quererme como soy, por la educación que me habéis proporcionado, por el respeto que me habéis infundido hacia los demás... No tengo palabras... Sois mi amanecer, la alegría de mi vida, mi felicidad, sois mi vida... Papá, mamá, sois un ejemplo de superación; vosotros me habéis enseñado a no rendirme y a luchar por lo que uno quiere, gracias por estar siempre conmigo, por sufrir conmigo cuando he estado mal, por ser mis guías... Cristi, eres lo más, eres otro ejemplo de superación, qué te voy a contar que no sepas, gracias por transmitirme desde Francia tu fortaleza, tu vitalidad y entusiasmo, por estar conmigo siempre que lo he necesitado, por hacerme olvidar mis problemas con cada una de tus visitas... (y también por usarme de voluntario forzado para practicar tus conocimientos de fisioterapia; a pesar de que a veces duele). Iván y Alicia muchas gracias por sacarme de mi rutina, por nuestras salidas al cine, de tapas, de turismo, a la playa, al casino (a ver si volvemos al buffet libre por cierto)... por ser como sois, por vuestra confianza, por vuestros consejos y por haber traído a este mundo a la personita más bonita y maravillosa, me hicisteis muy feliz cuando me disteis la buena nueva allá por el mes de abril de 2014. Carla ha sido un detonante en mí desde que hace un año llegó a nuestras vidas. Me ha proporcionado alegría, felicidad, confianza, dulzura. Cada vez que la veo se reactivan en mí todos mis sentidos. Es increíble cómo siendo tan pequeña puede tener tanto magnetismo, es mi talismán y me gustaría que cuando sea mayor y encuentre en algún rincón de casa esta tesis y lea mis palabras sepa lo mucho que su tío la quiere y cómo ella le inspiró para tratar de mejorar en su vida para convertirse en uno de sus ejemplos. Os quiero. Os lo vuelvo a decir, y lo diré siempre: ¡¡muchas gracias!!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	XI
SUMMARY.....	- 1 -
RESUMEN	- 5 -
1. INTRODUCCIÓN	- 9 -
1.1. ANTECEDENTES.....	- 11 -
1.2. <i>Ophiostoma piceae</i> : EL HONGO PRODUCTOR DE LA ESTEROL ESTERASA.....	- 14 -
1.3. ESTEROL ESTERASAS.....	- 20 -
1.3.1. Plegamiento α/β	- 20 -
1.3.2. Sitio de unión del sustrato.....	- 22 -
1.3.2.1. Triada catalítica	- 22 -
1.3.2.2. Bolsillo nucleofílico.....	- 22 -
1.3.2.3. Agujero oxianiónico.....	- 23 -
1.3.2.4. Anatomía diferencial de los sitios de unión en las lipasas: el sitio ABS	- 25 -
1.3.3. La tapadera	- 28 -
1.3.4. Mecanismo catalítico de lipasas y esterol esterases.....	- 28 -
1.3.4.1. Cambios conformacionales durante la catálisis	- 31 -
1.3.5. Reacciones catalizadas por lipasas y esterol esterases	- 34 -
1.3.6. No todas las lipasas presentan el plegamiento típico α/β -hidrolasa.....	- 35 -
1.3.7. Fuentes y familias de lipasas/esterol esterases.....	- 37 -
1.4. DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA ESTEROL ESTERASA DE <i>O. piceae</i> A PARTIR DE SU MODELADO COMPUTACIONAL POR HOMOLOGÍA.....	- 39 -
1.5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ENZIMAS EN <i>Pichia pastoris</i>	- 44 -
1.5.1. Levaduras metilótrofas, peroxisomas y metabolismo del metanol.....	- 44 -
1.5.1.1. Las levaduras metilótrofas	- 44 -
1.5.1.2. Peroxisomas.....	- 44 -
1.5.1.3. Metabolismo del metanol: ruta MUT (<i>methanol utilization</i>).....	- 45 -
1.5.2. Estructura del genoma de <i>P. pastoris</i> e importancia biotecnológica	- 47 -
1.5.3. Características de <i>P. pastoris</i> como sistema de expresión heteróloga.....	- 47 -
1.5.4. Factores que afectan la producción de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	- 48 -
1.5.5. Promotor AOX1, cepas y fenotipos en <i>P. pastoris</i>	- 50 -
1.5.6. Tecnología de bioprocesos y condiciones operacionales para cepas con pAOX1.....	- 52 -
1.6. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LIPASAS/ESTEROL ESTERASAS.....	- 55 -
1.6.1. Disminución de los problemas de <i>stickies</i> durante la producción de papel reciclado ..	- 55 -

1.6.2.	Síntesis de ésteres de esteroides vegetales como nutraceuticos.....	- 56 -
1.7.	OBJETIVOS	- 58 -
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	-59 -
2.1.	MICROORGANISMOS	- 61 -
2.1.1.	Cepas fúngicas	- 61 -
2.1.2.	Cepas bacterianas	- 61 -
2.2.	MEDIOS DE CULTIVO	- 61 -
2.2.1.	Medios de cultivo para bacterias.....	- 61 -
2.2.2.	Medios de cultivo para hongos filamentosos	- 62 -
2.2.3.	Medios de cultivo para <i>P. pastoris</i>	- 63 -
2.2.3.1.	<u>Medio de mantenimiento</u>	- 63 -
2.2.3.2.	<u>Medios de selección</u>	- 63 -
2.2.3.3.	<u>Medios de crecimiento y expresión en Erlenmeyer</u>	- 64 -
2.2.3.4.	<u>Medios de crecimiento y expresión en fermentador</u>	- 65 -
2.3.	MANTENIMIENTO DE CEPAS.....	- 68 -
2.3.1	Mantenimiento de cepas bacterianas	- 68 -
2.3.2.	Mantenimiento de cepas fúngicas	- 68 -
2.4.	CONDICIONES DE CULTIVO	- 68 -
2.4.1.	Condiciones de cultivo para <i>O. piceae</i>	- 68 -
2.4.2.	Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	- 68 -
2.4.3.	Condiciones de cultivo para <i>P. pastoris</i>	- 68 -
2.4.3.1.	<u>Condiciones de cultivo de la cepa recombinante GS115 (His⁺Mut⁺)</u>	- 69 -
2.4.3.2.	<u>Condiciones de cultivo de la cepa recombinante KM71 (His⁺Mut^s)</u>	- 69 -
2.5.	TAMPONES Y SOLUCIONES.....	- 69 -
2. 6.	DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	- 70 -
2.6.1.	Determinación del pH.....	- 70 -
2.6.2.	Determinación de la biomasa en medio líquido	- 70 -
2.6.2.1.	<u>Medida del crecimiento bacteriano</u>	- 70 -
2.6.2.2.	<u>Medida del crecimiento fúngico</u>	- 70 -
2.6.3.	Valoración de sustancias reductoras.....	- 71 -
2.6.4.	Determinación de la concentración de proteínas	- 71 -
2.6.5.	Valoración de la actividad enzimática	- 72 -
2.7.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y ADN RECOMBINANTE	- 72 -
2.7.1.	Vectores.....	- 72 -
2.7.2.	Oligonucleótidos cebadores.....	- 73 -
2.7.3.	Extracción de ADN genómico de <i>O. piceae</i>	- 75 -
2.7.4.	Purificación de ADN plasmídico	- 75 -
2.7.5.	Amplificación de ADN	- 75 -

2.7.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción	- 76 -
2.7.7. Desfosforilación de moléculas de ADN	- 76 -
2.7.8. Ligación de moléculas de ADN.....	- 76 -
2.7.9. Electroforesis en geles de agarosa.....	- 76 -
2.7.10. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	- 77 -
2.7.11. Construcción del vector de expresión en <i>P. pastoris</i>	- 77 -
2.7.12. Secuenciación automática de ADN y análisis de secuencias.....	- 78 -
2.7.13. Transformación de <i>E. coli</i> y análisis de transformantes	- 78 -
2.7.14. Transformación de <i>P. pastoris</i> y selección de transformantes	- 79 -
2.7.14.1. <u>Preparación de <i>P. pastoris</i> para la producción de esferoplastos</u>	- 79 -
2.7.14.2. <u>Transformación de esferoplastos de <i>P. pastoris</i> con ADN plasmídico</u>	- 79 -
2.7.14.3. <u>Selección de transformantes His⁺Mut⁺ e His⁺Mut^s</u>	- 80 -
2.8. CONCENTRACIÓN DE LAS ENZIMAS NATIVA Y RECOMBINANTE DE <i>O. piceae</i>	- 81 -
2.8.1. Ultrafiltración tangencial	- 81 -
2.8.2. Liofilización de las enzimas nativa y recombinante de <i>O. piceae</i>	- 82 -
2.8.3. Coliofilización de la enzima recombinante de <i>O. piceae</i> expresada en <i>P. pastoris</i> con ciclodextrinas	- 82 -
2.9. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE.....	- 83 -
2.9.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica	- 83 -
2.9.1.1. <u>Eliminación del Triton X-100 forma reducida</u>	- 83 -
2.9.2. Cromatografía de fase reversa	- 84 -
2.10. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS	- 84 -
2.10.1. Obtención del peso molecular.....	- 84 -
2.10.1.1 <u>Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) y tinción de proteínas</u>	- 84 -
2.10.1.2. <u>Densitometría de geles 1-D</u>	- 85 -
2.10.1.3. <u>Determinación de la masa molecular de la proteína por MALDI-TOF</u>	- 85 -
2.10.2. Desglicosilación	- 86 -
2.10.3. Isoelectroenfoque	- 86 -
2.10.4 Caracterización bioquímica de la enzima recombinante.....	- 88 -
2.10.4.1. <u>pH óptimo y estabilidad vs pH</u>	- 88 -
2.10.4.2. <u>Temperatura óptima y estabilidad vs temperatura</u>	- 88 -
2.10.4.3. <u>Actividad en presencia de detergentes e iones</u>	- 88 -
2.10.5. Caracterización cinética de la enzima recombinante en estado estacionario.....	- 88 -
2.10.6. Estudio de modificaciones postraduccionales.....	- 91 -
2.10.6.1. <u>Análisis de aminoácidos para la búsqueda de metioninas oxidadas</u>	- 91 -
2.10.6.2. <u>Análisis por MALDI-TOF/TOF</u>	- 91 -
2.10.6.2.1. Digestión trípica en solución.....	- 91 -

2.10.6.2.2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	- 91 -
2.10.6.2.3 Determinación de N-glicosilaciones por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF-	92
-	
2.10.7. Dicroísmo circular.....	- 92 -
2.10.8. Determinación del N-terminal	- 92 -
2.10.9. Ultracentrifugación analítica	- 93 -
2.11. ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA RECOMBINANTE	- 93 -
2.11.1. Equipamiento empleado.....	- 93 -
2.11.1.1. <u>Fermentadores</u>	- 93 -
2.11.1.2. <u>Analizador de metanol</u>	- 93 -
2.11.1.3. <u>Sistema de adición automática de sustratos</u>	- 94 -
2.11.1.4. <u>Programas informáticos</u>	- 94 -
2.11.2. Preparación de los reactores para el desarrollo de bioprocesos con <i>P. pastoris</i>	- 97 -
2.11.2.1 <u>Pasos comunes en la preparación de un reactor para bioprocesos operando en discontinuo y discontinuo alimentado (primera fase)</u>	- 97 -
2.11.2.2. <u>Pasos para la preparación del reactor Biostat B en bioprocesos de elevada densidad celular operando en discontinuo alimentado</u>	- 98 -
2.11.3. Condiciones de cultivo para bioprocesos con <i>P. pastoris</i>	- 100 -
2.11.3.1. <u>Preparación del preinóculo</u>	- 100 -
2.11.3.2. <u>Condiciones de cultivo en bioprocesos operando en discontinuo</u>	- 100 -
2.11.3.3. <u>Condiciones de cultivo en bioprocesos de elevada densidad celular operando en discontinuo alimentado</u>	- 100 -
2.11.4. Métodos analíticos	- 103 -
2.11.4.1. <u>Determinación de la biomasa total</u>	- 103 -
2.11.4.2. <u>Determinación de las concentraciones de glicerol, sorbitol y metanol</u>	- 103 -
2.11.5. Cálculos.....	- 103 -
2.11.5.1. <u>Cálculo de los rendimientos</u>	- 103 -
2.11.5.2. <u>Cálculo de productividades</u>	- 104 -
2.12. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	- 104 -
2.12.1. Reacciones de hidrólisis del acetato de polivinilo (PVAc).....	- 104 -
2.12.1.1. <u>Análisis de la desacetilación mediante Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)</u>	- 105 -
2.12.1.2. <u>Análisis de la desacetilación mediante Espectrometría de masas MALDI-TOF</u>	- 105 -
2.12.1.3. <u>Análisis del ácido liberado en reacciones en pH-stato</u>	- 105 -
2.12.2. Reacciones de síntesis	- 107 -
2.12.2.1. <u>Síntesis de oleato de heptilo</u>	- 107 -
2.12.2.2. <u>Síntesis de ésteres de fitoesteres con ácidos grasos</u>	- 108 -

2.12.2.2.1. Identificación de fitoesteroles.....	- 108 -
2.12.2.2.2. Síntesis de ésteres de fitoesteroles	- 108 -
2.13. INGENIERÍA ENZIMÁTICA: INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA Y CARACTERIZACIÓN.....	- 109 -
2.13.1. Preparación del biocatalizador inmovilizado.....	- 109 -
2.13.2. Caracterización del biocatalizador inmovilizado	- 109 -
2.13.2.1. <u>Caracterización mediante microscopía confocal</u>	- 109 -
2.13.2.2. <u>Caracterización bioquímica</u>	- 110 -
2.13.2.3. <u>Aplicación del biocatalizador inmovilizado</u>	- 110 -
2.14. ESTUDIOS DE CRISTALIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA	- 111 -
3. RESULTADOS	- 113 -
3.1. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA NATIVA DE <i>O. piceae</i>	- 115 -
3.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ESTERASA DE <i>O. piceae</i> EN <i>P. pastoris</i>	- 115 -
3.2.1. Selección de transformantes His ⁺ Mut ⁺	- 115 -
3.2.2. Estudios de expresión del transformante Mut ⁺ en Erlenmeyer.....	- 116 -
3.2.3. Estudios de inducción/desrepresión de pAOX1.....	- 119 -
3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE. COMPARACIÓN CON LA ENZIMA NATIVA.....	- 120 -
3.3.1. Etapas y rendimiento de la purificación.....	- 120 -
3.3.2. Características fisicoquímicas	- 121 -
3.3.2.1. <u>Masa molecular y grado de glicosilación</u>	- 121 -
3.3.2.2. <u>Punto isoelectrico</u>	- 122 -
3.3.2.3. <u>Actividad y estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura</u>	- 123 -
3.3.2.4. <u>Actividad frente a iones y detergentes</u>	- 126 -
3.3.3. Características cinéticas en estado estacionario	- 127 -
3.3.4. Características espectroscópicas: dicroísmo circular UV	- 128 -
3.3.5. Estudio de modificaciones postraduccionales en la proteína recombinante	- 128 -
3.3.5.1. <u>N-glicosilación</u>	- 128 -
3.3.5.1.1. Estudio por espectrometría de masas	- 129 -
3.3.5.1.2. Efecto de la desglicosilación en la actividad de las enzimas nativa y recombinante	- 130 -
3.3.5.2. <u>Oxidación de metioninas</u>	- 131 -
3.3.6. Secuenciación del extremo N-terminal de la proteína recombinante	- 134 -
3.3.7. Estudios sobre la agregación en las enzimas nativa y recombinante.....	- 134 -
3.4. ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE.....	- 136 -
3.4.1. Selección de transformantes His ⁺ Mut ^s	- 136 -
3.4.2. Procesos operando en discontinuo	- 138 -
3.4.3. Procesos operando en discontinuo alimentado.....	- 140 -

3.5.	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS ENZIMAS NATIVA Y RECOMBIANTE DE <i>O. piceae</i>	- 144 -
3.5.1.	Reducción de los problemas de <i>stickies</i> durante la producción de papel reciclado. Desacetilación de PVAc.....	- 144 -
3.5.2.	Síntesis de compuestos de interés.	- 146 -
3.5.2.1.	Verificación de la capacidad de las enzimas de <i>O. piceae</i> de catalizar reacciones de síntesis ...	- 146 -
3.5.2.2.	Síntesis de ésteres de esteroides como nutraceuticos	- 147 -
3.6.	INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA ENZIMA NATIVA DE <i>O. piceae</i> EN DILBEADS™ TA.....	- 153 -
3.7.	CRISTALIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA DE <i>O. piceae</i>	- 157 -
4.	DISCUSIÓN	- 159 -
4.1.	PRODUCCIÓN DE LA ESTEROL ESTERASA POR <i>O. piceae</i>	- 161 -
4.2.	EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ESTEROL ESTERASA DE <i>O. piceae</i> EN <i>P. pastoris</i> -	- 162 -
4.2.1.	Expresión en Erlenmeyer.....	- 162 -
4.2.2.	Estudios de inducción/desrepresión del pAOX1.....	- 164 -
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE.....	- 165 -
4.4.	ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE	- 170 -
4.5.	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS ENZIMAS DE <i>O. piceae</i>	- 174 -
4.5.1.	Reducción de los problemas de <i>stickies</i> durante la producción de papel reciclado. Desacetilación de PVAc.....	- 174 -
4.5.2.	Síntesis de ésteres de esteroides como nutraceuticos	- 177 -
4.6.	INGENIERÍA DE ENZIMAS: INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA.....	- 180 -
5.	CONCLUSIONES	- 183 -
6.	BIBLIOGRAFÍA	- 187 -
7.	ANEXO	- 209 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución del mercado de enzimas según las ventas de Novozymes en el año 2.014.....	- 12 -
Figura 1.2. El ciclo de la biocatálisis.....	- 13 -
Figura 1.3. Hongos del azulado de la madera.....	- 16 -
Figura 1.4. Cladograma del orden de los <i>Ophiostomatales</i>	- 17 -
Figura 1.5. Dimorfismo de <i>O. piceae</i>	- 19 -
Figura 1.6. Representación de la estructura secundaria de las hidrolasas	- 21 -
Figura 1.7. Interacciones posibles entre sustratos y los residuos que configuran el centro activo de la enzima.....	- 25 -
Figura 1.8. Forma del sitio de unión de lipasas.....	- 27 -
Figura 1.9. Mecanismo catalítico de esteroles esterases	- 30 -
Figura 1.10. Estados conformacionales cerrado y abierto de la lipasa de <i>C. rugosa</i>	- 32 -
Figura 1.11. Interacciones entre las moléculas de carbohidrato unidas al residuo Asn351 y los residuos de la tapadera en el estado conformacional abierto de la LIP1 de <i>C. rugosa</i>	- 34 -
Figura 1.12. Tipo de reacciones catalizadas por lipasas en solución acuosa y orgánica	- 35 -
Figura 1.13. Esterasas/Lipasas de tipo GDSL.....	- 36 -
Figura 1.14. Estructura secundaria de la esteroles esterasa de <i>O. piceae</i>	- 40 -
Figura 1.15. Estructura terciaria de la esteroles esterasa de <i>O. piceae</i>	- 42 -
Figura 1.16. <i>P. pastoris</i>	- 46 -
Figura 1.17. Problemática del PVAc en la producción de papel reciclado	- 56 -
Figura 1.18. Acción de los fitoesteres a nivel intestinal	- 57 -
Figura 2.1. Mapa circular del vector pGEM®-T Easy.....	- 73 -
Figura 2.2. Mapa circular del vector pPIC9.....	- 73 -
Figura 2.3. Esquematización del proceso de clonación de la secuencia madura de la esteroles esterasa de <i>O. piceae</i> y su expresión en <i>P. pastoris</i>	- 81 -
Figura 2.4. Ciclodextrinas.....	- 83 -
Figura 2.5. Reacción de hidrólisis del butirato de α -naftilo en presencia de <i>Fast Garnet GBC</i> para dar el complejo sulfato de α -naftilo/ <i>Fast Garnet GBC</i>	- 87 -
Figura 2.6. Fórmulas estructurales de los sustratos empleados para la caracterización cinética de la enzima recombinante.....	- 89 -
Figura 2.7. pH-stato DL50.....	- 90 -
Figura 2.8. Fermentador Applikon® para bioprocesos en discontinuo.....	- 95 -
Figura 2.9. Fermentador Biostat B (Braun) adaptado para bioprocesos en discontinuo alimentado.	- 95 -
Figura 2.10. Esquema del equipamiento empleado para bioprocesos en discontinuo alimentado.....	- 96 -
Figura 2.11. Hidrólisis enzimática de PVAc	- 105 -
Figura 2.12. Reacción de síntesis de oleato de heptilo.....	- 107 -
Figura 2.13. Montaje del reactor enzimático (esteroles esterasa inmovilizada y empaquetada en columna HR 5/5) para el estudio de la hidrólisis continua de oleato de colesterol.....	- 111 -
Figura 2.14. Técnicas de cristalización de proteínas	- 112 -
Figura 3.1. Evolución de los cultivos de <i>O. piceae</i> suplementados con aceite de oliva (0,5%)	- 115 -
Figura 3.2. Selección de transformantes His ⁺ Mut ⁺	- 116 -
Figura 3.3. Producción de esterasa recombinante en diferentes medios de cultivo	- 118 -
Figura 3.4. Influencia del sorbitol sobre la inducción/desrepresión de pAOX1.....	- 119 -
Figura 3.5. Efecto de la concentración de metanol en la expresión heteróloga de la esteroles esterasa de <i>O. piceae</i> en medio YEPS	- 120 -
Figura 3.6. Perfil de cromatografía de interacción hidrofóbica de la purificación de la enzima recombinante	- 121 -
Figura 3.7. Estimación de la masa molecular de la enzima recombinante	- 122 -

Figura 3.8. Isoelectroenfoque de la proteína recombinante.....	- 122 -
Figura 3.9. Actividad óptima de la enzima recombinante y estabilidad frente al pH tras 24 h	- 123 -
Figura 3.10. Comparación de las estabilidades frente al pH, tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa y recombinante.....	- 125 -
Figura 3.12. Comparación de las termoestabilidades, tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa y recombinante	- 125 -
Figura 3.13. Espectroscopía de Dicroísmo Circular	- 128 -
Figura 3.14. Sitios potenciales de N-glicosilación en el modelo de la esterasa recombinante.	- 129 -
Figura 3.15. Huella peptídica de la enzima recombinante	- 130 -
Figura 3.16. Actividad de las enzimas nativa y recombinante de <i>O. piceae</i> antes y después del tratamiento con Endo H.	- 130 -
Figura 3.17. Residuos de metioninas en OPE*.	- 131 -
Figura 3.18. Análisis de aminoácidos de la proteína nativa y recombinante.....	- 132 -
Figura 3.19. Perfiles de purificación de las enzimas nativa y recombinante de <i>O.piceae</i> por cromatografía de fase reversa.....	- 133 -
Figura 3.20. Oxidación de la enzima nativa	- 134 -
Figura 3.21. Velocidades de sedimentación de la estero esterasa nativa y recombinante.....	- 135 -
Figura 3.22. Equilibrios de sedimentación.....	- 136 -
Figura 3.23. Selección de transformantes Mut ^s en medio BMM	- 137 -
Figura 3.24. Bioprocesos en discontinuo en medio YNB.....	- 139 -
Figura 3.25. Bioprocesos en discontinuo alimentado en medio MBS	- 141 -
Figura 3.26. Análisis de proteínas por SDS-PAGE después del procesamiento de los crudos	- 142 -
Figura 3.27. Descripción general del escalado de la producción de OPE*	- 143 -
Figura 3.28. Hidrólisis enzimática de PVAc	- 145 -
Figura 3.29. Síntesis enzimática de oleato de heptilo	- 146 -
Figura 3.30. Identificación por CG-EM de esteroles vegetales en una mezcla comercial de β -sitosterol.....	- 147 -
Figura 3.31. Cromatogramas de gases ilustrativos de la reacción de acilación de fitoesteroles de soja con ácido laurico mediante reacción de esterificación directa.	- 148 -
Figura 3.32. Efecto del exceso de ácido láurico en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroles vegetales.....	- 149 -
Figura 3.33. Efecto de la dosis de enzima en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroles vegetales	- 151 -
Figura 3.34. Efecto del tipo de solvente orgánico en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroles vegetales.....	- 152 -
Figura 3.35. Inmovilización de la estero esterasa de <i>O. piceae</i> en Dilbeads™ TA	- 153 -
Figura 3.36. Actividad óptima de la enzima inmovilizada y estabilidad frente al pH comparada con la enzima soluble tras 24 h.....	- 154 -
Figura 3.37. Temperatura óptima de la enzima recombinante y termoestabilidad comparada con la enzima soluble tras 24 h.....	- 155 -
Figura 3.38. Comparación de las estabilidades al pH y temperatura, tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa soluble e inmovilizada.....	- 156 -
Figura 4.1. Secreción de proteínas con Factor α como secuencia señal de externalización en <i>Pichia pastoris</i>	- 168 -
Figura 4.2. Velocidad específica de crecimiento en procesos operando en discontinuo alimentado... -	172 -
Figura 4.3. Comparación de la estero esterasa de <i>O. piceae</i> con la esterasa de <i>M. grisea</i>	- 176 -
Figura 4.4. Efecto del tipo de sistema, bifásico o monofásico, sobre el estado de solvatación de las enzimas de <i>O. piceae</i>	- 180 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales características bioquímicas de lipasas	- 39 -
Tabla 1.2. Comparación de los posibles residuos determinantes de la especificidad en isoenzimas de <i>C. rugosa</i> y la esterase de <i>O. piceae</i>	- 43 -
Tabla 2.1. Cepas fúngicas.....	- 61 -
Tabla 2.2. Cepa bacteriana	- 61 -
Tabla 2.3. Composición del medio LB.....	- 61 -
Tabla 2.4. Composición del medio Ψ broth.....	- 62 -
Tabla 2.5. Composición del medio agar-malta.....	- 62 -
Tabla 2.6. Composición del medio <i>Czapeck-Dox</i> modificado.....	- 62 -
Tabla 2.7. Composición de la solución de elementos traza	- 62 -
Tabla 2.8. Composición del medio YPD.....	- 63 -
Tabla 2.9. Composición de los medios RDB y RDHB	- 63 -
Tabla 2.10. Composición de la solución de aminoácidos del medio RDB y RDHB.....	- 63 -
Tabla 2.11. Composición de los medios MM y MD	- 64 -
Tabla 2.12. Composición de los medios BMGY y BMMY	- 64 -
Tabla 2.13. Composición de los medios BMG y BMM.....	- 65 -
Tabla 2.14. Composición del medio MGY	- 65 -
Tabla 2.15. Composición del medio YEPS	- 65 -
Tabla 2.16. Composición del medio YNB	- 66 -
Tabla 2.17. Composición de la solución de micronutrientes PTM ₁	- 66 -
Tabla 2.18. Composición del medio MBS-Invitrogen™.....	- 66 -
Tabla 2.19. Recopilación de los medios de cultivo empleados	- 67 -
Tabla 2.20. Tampones y soluciones.....	- 70 -
Tabla 2.21. Secuencias de oligonucleótidos cebadores.....	- 74 -
Tabla 2.22. Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia madura de la esterase	- 75 -
Tabla 2.23. Programa del termociclador para la amplificación de la secuencia codificante de la región madura de la esterase	- 76 -
Tabla 2.24. Características de α -, β - y γ -CDs	- 83 -
Tabla 2.25. Composición geles de acrilamida SDS-PAGE.....	- 84 -
Tabla 2.26. Composición del gel de isoelectroenfoque	- 86 -
Tabla 2.27. Solución de revelado para el zimograma.....	- 87 -
Tabla 2.28. Programa de adición de sustratos en la fase de transición para bioprocesos en discontinuo alimentado con la cepa Mut ⁺	- 98 -
Tabla 2.29. Resumen de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas según el bioproceso y la base necesaria para mantener el pH.....	- 102 -
Tabla 2.30. Preparados enzimáticos comerciales empleados para la desacetilación de PVAc.....	- 106 -
Tabla 2.31. Características solventes orgánicos.....	- 109 -
Tabla 3.1. Rendimiento y grado de purificación de la enzima recombinante.....	- 121 -
Tabla 3.2. Efecto de iones en la actividad de OPE*	- 126 -
Tabla 3.3. Efecto de detergentes en la actividad de OPE*	- 126 -
Tabla 3.4. Parámetros cinéticos aparentes de las esterase de <i>O. piceae</i> sobre ésteres de <i>p</i> -nitrofenol, glicerol y colesterol.....	- 127 -
Tabla 3.5. Comparación de los parámetros de proceso de diferentes fenotipos de <i>P. pastoris</i> expresando OPE* bajo el control de <i>P_{AOX1}</i> en cultivos en discontinuo en biorreactor.....	- 139 -
Tabla 3.6. Comparación de los parámetros de proceso de distintos fenotipos de <i>P. pastoris</i> expresando OPE* bajo el control de <i>P_{AOX1}</i> en cultivos en discontinuo alimentado	- 142 -

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AOX	Alcohol Oxidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
DCW	<i>Dry Cell Weight</i>
dNTP	Dinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DOT	<i>Dissolved Oxygen Tension</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
K_m^{ap}	Constante cinética de segundo orden aparente
k_{cat}^{ap}	Número de recambio
kDa	Kilodalton
MeOH	Metanol
o/n	<i>overnight</i>
OPE	Esterol esterasa de <i>Ophiostoma piceae</i>
OPE*	Esterol esterasa recombinante de <i>O. piceae</i>
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
pAOX1	Promotor de la alcohol oxidasa 1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVA	Alcohol polivinílico
PVAc	Acetato de polivinilo
PEG	Polietilenglicol
pb	Par de bases
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	<i>Relative Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
S	Svedberg, equivale a 10^{-13} segundos
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiléndiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
URS	<i>Upstream Repressing Sequence</i>
UV	Ultravioleta
UTR	<i>Untranslated región</i>
V_m^{ap}	Velocidad máxima aparente
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda
ν	Número de onda

SUMMARY

Lipases and esterases are versatile biocatalysts and the most used kind of enzymes for biotechnological purposes. *Ophiostoma piceae* produces a sterol esterase (OPE) with high affinity on triglycerides and sterol esters that is able to hydrolyse efficiently natural mixtures of these compounds from wood extractives. Due to these properties, the use of this enzyme has been proposed to decrease the pitch deposition problem in hardwood and softwood pulping.

The mature protein sequence of OPE has been expressed successfully in Mut⁺ and Mut^s *Pichia pastoris* strains, which differ in their ability for metabolizing methanol as inducer of expression, resulting in higher levels of activity than those obtained in *O. piceae* Erlenmeyer cultures. In addition, the production of recombinant enzyme (OPE*) was scaled to bioreactor operating in batch and fed-batch processes using both strains. In all the conditions assayed the activity levels were higher than those obtained in Erlenmeyer flask, reaching the maximum activity (~30 U/mL) with Mut^s strain operating in a sorbitol co-feeding strategy during fed-batch cultivation.

The kinetic characterization of the recombinant protein showed an improved enzyme with higher apparent catalytic efficiency than the native enzyme (~8-fold) for all the substrates assayed (*p*-nitrophenol, glycerol and cholesterol esters). Neither the greatest level of N-glycosylation nor the presence of oxidized methionine residues in the substrate-binding region of OPE* seem to be responsible of this improvement. Circular dichroism studies showed changes in their spectra but data analysis (K2d method from DichroWeb) resulted in an identical content of α -helix (0.46) and β -sheet (0.23) for both proteins, so no changes in their secondary structure were revealed. The main difference was found in the N-terminal sequence of OPE* which contained 6-8 more residues than OPE. These were derived from the vector used for the protein expression coupled with an inefficient processing of the α -mating factor pre-propeptide from *Saccharomyces cerevisiae* used for secretion. This affect the aggregation state detected in OPE* (lower than the reported in OPE) improving its catalytic efficiency.

New biotechnological applications for this enzyme have been studied since: i) it is able to deacetylate polyvinyl acetate (PVAc), one of the compounds identified in the stickies formed during recycled paper production, what has been confirmed using FTIR spectroscopy, mass spectrometry analysis and titrimetry. The achieved results under the assayed conditions were comparable to those gotten with the specifically commercialized for this aim Optizyme® 530. ii) It synthesizes esters in organic media and has been used in the synthesis of phytosterol esters, as nutraceutical products. In this case, the influence of substrate and enzyme concentration and the effect of different organic solvents with and without water in the reactions have been studied. The results showed that enzymes from *O. piceae* seem to have similar synthetic activity, even better under some conditions, to the commercial enzyme from *C. rugosa* used; getting an overall production of steryl esters of 60-80% within 24 hours depending on the molar excess of substrate, fact that has been patented.

In relation with its potential industrial application, the native enzyme has been successfully immobilized through activated epoxy groups in the new Dilbeads™ carrier. The immobilized biocatalyst showed significant better stabilities at high pH and temperatures values than soluble enzyme and was able to hydrolyze cholesteryl oleate throughout several days when was packed as a bioreactor.

Finally, different crystallization experiments have been done with native enzyme. However, its high aggregation behaviour did not allow obtaining good quality crystals for X- ray diffraction.

RESUMEN

Las lipasas y esterasas son biocatalizadores versátiles y el tipo más utilizado de enzimas para fines biotecnológicos. El hongo *Ophiostoma piceae* produce un estero esterasa (OPE) con alta afinidad sobre triglicéridos y ésteres de estero siendo capaz de hidrolizar eficazmente mezclas naturales de estos compuestos a partir de extractos de madera. Debido a estas propiedades, se ha propuesto el uso de esta enzima para disminuir el problema de la deposición de *pitch* en la fabricación de pasta de madera procedente de coníferas y frondosas.

La secuencia de la proteína madura de la OPE se ha expresado con éxito en cepas Mut⁺ y Mut^s de *Pichia pastoris*, que difieren en su capacidad de metabolizar metanol como inductor de la expresión, dando como resultado niveles más altos de actividad que los obtenidos en cultivos en Erlenmeyer de *O. piceae*. Además, la producción de la enzima recombinante (OPE*) se escaló a biorreactor operando en discontinuo y discontinuo-alimentado utilizando ambas cepas. En todas las condiciones ensayadas los niveles de actividad fueron mayores que los obtenidos previamente en matraz Erlenmeyer, alcanzando la actividad máxima (30 U/ml) con la cepa Mut^s operando en una estrategia con sorbitol como co-sustrato durante cultivo en discontinuo alimentado.

La caracterización cinética de la proteína recombinante mostró una enzima mejorada con una eficacia catalítica aparente más elevada que la enzima nativa (~ 8 veces) para todos los sustratos ensayados (ésteres de *p*-nitrofenol, glicerol y colesterol). Ni el mayor nivel de N-glicosilación ni la presencia de residuos de metionina oxidados en la región de unión al sustrato de OPE* parecen ser responsables de esta mejora. Estudios de dicroísmo circular mostraron cambios en sus espectros, pero el análisis de los datos (método K2d de *DichroWeb*) dio como resultado un contenido idéntico en hélices α (0,46) y láminas β (0,23) para ambas proteínas indicando la ausencia de cambios en su estructura secundaria. Ahora bien, la principal diferencia en ellas se encontró en la secuencia N-terminal de la OPE* que contenía 6-8 residuos más que OPE. Estos residuos procedían del vector utilizado para la expresión de la proteína y del procesamiento ineficiente del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado para la secreción. Esto afecta al estado de agregación detectado en OPE* (inferior a la descrita en OPE) lo que mejora su eficiencia catalítica.

Dado su potencial, se han estudiado nuevas aplicaciones biotecnológicas para esta enzima: i) desacetilación de acetato de polivinilo (PVAc), uno de los compuestos identificados en los *stickies* formados durante la producción de papel reciclado. La capacidad de la enzima para realizar tal reacción ha sido confirmada mediante espectroscopía de FTIR, análisis de espectrometría de masas y titulación; de modo que, los resultados obtenidos, en las condiciones de ensayo, muestran una actividad semejante a la de la enzima Optizyme® 530 comercializada para este fin. ii) Síntesis de ésteres en medios orgánicos, concretamente de ésteres de fitoesterol, como productos nutracéuticos. En este caso, la influencia de la concentración de enzima y sustrato y el efecto de diferentes disolventes orgánicos junto a la presencia y ausencia de agua en las reacciones han sido estudiados. Los resultados obtenidos han permitido patentar el empleo de la enzima para tal fin al ser semejantes a los alcanzados con la enzima comercial de *C. rugosa* empleada en la comparación e incluso algo mejores en algunas circunstancias. Se observó un total de producción de ésteres de estero del 60% en 24 horas cuando se usó un pequeño exceso de sustrato aumentando al 80% con excesos mayores.

Pensando en su posible uso industrial, la enzima nativa ha sido inmovilizada con éxito a través de grupos epoxi activados en un nuevo soporte llamado Dilbeads™. El biocatalizador inmovilizado resultó ser significativamente más estable a valores altos de pH y temperatura que la enzima soluble y conservó la capacidad de hidrolizar oleato de colesterol durante varios días cuando fue empaquetado a modo de biorreactor.

Por último, se han realizado diferentes experimentos de cristalización con la enzima nativa. Sin embargo, la alta tendencia que muestra a formar agregados impidió la obtención de cristales de buena calidad para los estudios de difracción de rayos X.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Según los informes de finales de los años ochenta de la *Office of Technology Assessment* de EEUU (OTA) (U.S.Congress, 1988) se puede definir el término “biotecnología” desde un punto de vista amplio como cualquier técnica que utiliza organismos vivos (o parte de ellos) para la obtención o modificación de productos, la mejora de plantas o animales, o para el desarrollo de microorganismos para fines específicos. Se trata de un campo relativamente reciente que integra conocimiento de varias disciplinas más tradicionales como la bioquímica, química, ingeniería química y microbiología; aunque, ya desde los albores de la civilización el hombre ha seleccionado deliberadamente organismos para mejorar la agricultura y la ganadería. Existe una segunda definición más exacta de acuerdo a las nuevas técnicas aparecidas durante los últimos años y según la cual “biotecnología” sería el uso industrial de ADN recombinante, fusión celular y nuevas técnicas de bioprocesos para la obtención o modificación de productos, mejora animal y vegetal, o para el desarrollo de microorganismos para fines específicos.

En los últimos años el uso de la biotecnología ha permitido desde la mejora de la diagnosis y tratamiento de algunas enfermedades hereditarias, pasando por la obtención de nuevos pesticidas y herbicidas más respetuosos con el medio ambiente, hasta la aplicación de procesos microbiológicos para biorremediación. Surgen así los conceptos de “biotecnología roja” o “biotecnología médico-farmacéutica”, “biotecnología blanca” para hacer referencia a la “biotecnología industrial”, “biotecnología verde” para la mejora de la agricultura y “biotecnología azul” o marina.

El trabajo que se presenta en la presente tesis doctoral trata sobre la expresión heteróloga, caracterización y el potencial biotecnológico de una esterol esterasa producida por el ascomiceto *Ophiostoma piceae* constituyendo en sí un ejemplo de biotecnología blanca.

Tal y como se ha expuesto, la biotecnología industrial considera el empleo de organismos y/o sus productos para determinadas aplicaciones. Cuando se habla de organismos se debe hacer hincapié en que los microorganismos constituyen el primer escalafón en cuanto a candidatos para su utilización pues bien es sabido acerca de su gran diversidad y versatilidad. Cuando se refiere a sus productos se puede entender que de los más importantes son la gran cantidad de enzimas distintas que pueden llegar a producir y que se emplean para una gran variedad de procesos de interés industrial.

En este sentido la búsqueda de microorganismos y la caracterización de las enzimas que producen han sido y sigue siendo una constante en cualquier investigación de este campo y que hoy en día gracias al desarrollo de la metagenómica permite la obtención de miles de secuencias con posible potencial industrial.

Se conocen unas 4.000 enzimas de las cuales sólo 200 tipos se comercializan y sólo 20 se producen industrialmente. Cerca del 75% de las enzimas comercializadas lo son por tres grandes compañías: Novozymes, Dupont (Danisco) y Roche (Li *et al.*, 2012). En el año 2014 sólo Novozymes representaba el 48% de la cuota del mercado global de enzimas industriales, valorado en 3 billones de euros, según se desprende de su informe anual (Novozymes, 2014). El 75% de todas las enzimas industriales comercializadas son hidrolasas (amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, amilasas,...) y representan un 70% de las ventas, concretamente las proteasas constituyen cerca del 40% de las ventas de enzimas y su principal mercado es el de los detergentes (Leisola *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012).

Según los datos desprendidos del informe elaborado por Novozymes, se puede observar de sus ventas del año 2014 que el mercado de las enzimas se puede dividir en cinco áreas de aplicación por contribución de ventas (**figura 1.1**) según el siguiente orden: detergentes (lavavajillas, lavandería, cuidado personal), alimentos y bebidas, bioenergía (biocombustibles), agricultura y piensos animales y otras enzimas técnicas (textil, pasta de papel, síntesis orgánica,...).

-Introducción-

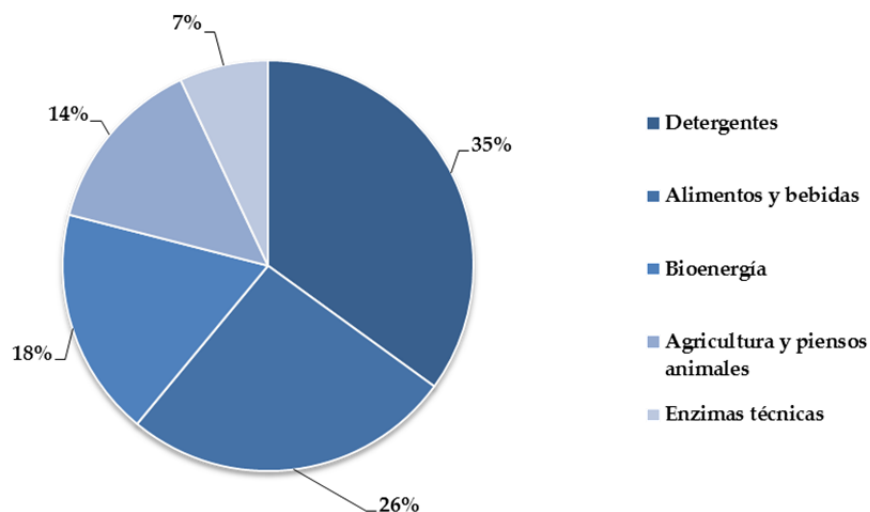


Figura 1.1. Distribución del mercado de enzimas según las ventas de Novozymes en el año 2014 (Novozymes, 2014).

De entre todos los tipos de enzimas la más usada para las distintas áreas es la α -amilasa, aunque las lipasas han ido creciendo en importancia en los últimos años; así como las enzimas que tienen que ver con la obtención de alimentos saludables (Li *et al.*, 2012; Novozymes, 2012).

Desde un punto de vista regional, Norteamérica y la zona Este de Europa son sin duda las mayores consumidoras de enzimas; sin embargo, se piensa que debido a la crisis económica actual, la mayor demandante de enzimas en los próximos años será la zona Asia/Pacífico debido a la fuerza de los mercados indio, chino y japonés (Li *et al.*, 2012; Novozymes, 2014).

El mercado de enzimas industriales se encuentra en constante crecimiento debido a las mejoras en las tecnologías de producción, la mejora introducida por ingeniería de proteínas en las propiedades de las enzimas y los nuevos campos de aplicación (Leisola *et al.*, 2009); de forma que, para el año 2015 se estima que el mercado global de enzimas estará valorado en 6 billones de euros (Li *et al.*, 2012).

La “tecnología enzimática” se puede definir en un sentido amplio como la aplicación de enzimas libres o células (entendiéndose como biocatalizador) para la producción de bienes y utilidades. En un sentido más estricto se trataría de los conceptos tecnológicos que permiten el uso de enzimas en procesos competitivos biotecnológicos a gran escala (Panke y Wubbolts, 2002). Presenta una naturaleza interdisciplinaria y es reconocida por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) como un componente imprescindible para el desarrollo industrial sostenible permitiendo no sólo un ahorro en los costes operativos de los procesos optimizados del 9-90% sino también un ahorro de energía y materias primas (van Beilen y Li, 2002).

La **figura 1.2** muestra las diferentes fases en el desarrollo de un proceso biocatalítico y se detallan algunos de los aspectos clave de cada etapa. Este esquema o ciclo sería la base de partida a partir de la cual se ha diseñado la presente tesis doctoral: desde la identificación de reacciones específicas o procesos industriales existentes susceptibles de mejora por tecnología enzimática, pasando por la búsqueda de biocatalizadores adecuados de acuerdo a los límites de la reacción de interés, su caracterización, modificación, producción, aplicación y hasta la recuperación final del producto generado, en su caso.

Muchas de las enzimas industriales son de naturaleza fúngica. En sus hábitats naturales los hongos filamentosos secretan enzimas como proteasas, hemicelulasas, amilasas, quitinasas, esterases y lipasas para la degradación de grandes biopolímeros (proteínas, polisacáridos vegetales, etc.) en oligómeros o

monómeros que utilizan como nutrientes. Además de ser fuente de una gran cantidad de enzimas industriales, los hongos filamentosos pueden llegar a ser también muy eficientes en la producción y secreción de estas enzimas. Es más, algunos pueden ser fácilmente cultivables en altas densidades en fermentadores sobre sustratos más o menos baratos. Todas estas características los han convertido en las biofactorías preferidas para la producción de proteínas. Los principales hongos filamentosos usados en la actualidad corresponden a los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*. Las especies usadas normalmente de *Aspergillus* son *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans* y *A. sojae* y lo son especialmente para la producción de hidrolasas, sobre todo amilasas y proteasas. *T. reesei* es un gran productor de celulasas. Además, ambos se emplean como hospedadores para la producción heteróloga de otras enzimas de interés (Visser *et al.*, 2011).



Figura 1.2. El ciclo de la biocatálisis. Adaptado de van Beilen y Li, 2002.

En el caso que nos ocupa, las enzimas de las familias de las esterases, lipasas y esterol esterases han sido siempre muy apreciadas no sólo por su capacidad hidrolítica sino también por la de síntesis para la industria química y farmacéutica.

Desde la década de los 90, se han venido estudiando las enzimas de estas familias producidas tanto por bacterias y hongos y las condiciones necesarias para potenciar su producción. Obviamente, en un principio fueron microorganismos de naturaleza industrial los más estudiados, así se pudo comprobar los perfiles enzimáticos de bacterias como *Pseudomonas* y hongos levaduriformes como *Candida rugosa*. Es en este contexto, en el que se desarrolló la búsqueda de microorganismos, concretamente hongos filamentosos, productores de actividad esterol esterase para su aplicación en la industria papelera para reducir los depósitos conocidos con el nombre de *pitch* durante la producción de pasta de papel, especialmente la procedente de madera de frondosas, como el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), por su alto contenido en este tipo específico de compuestos. De entre los distintos estudiados, finalmente el ascomiceto

-Introducción-

Ophiostoma piceae fue seleccionado por ser capaz de hidrolizar oleato de colesterilo como compuesto modelo (Calero-Rueda, 2001).

El *pitch* se puede definir como el conjunto de extraíbles de la madera, aditivos añadidos durante el pulpeo de la pasta de papel y fibras de madera (Allen, 1980). Sus consecuencias más inmediatas son el incremento en la necesidad de agentes químicos para el pulpeo y el blanqueamiento, afecta las propiedades físicas de la pasta, colapsa la máquina de papel y ocasiona agujeros y zonas de apariencia sucia sobre la pasta (Hillis, 1962). Con respecto a los primeros, se ha comprobado que estos compuestos (siendo el β -sitosterol el mayoritario con un 75%) proceden principalmente de depósitos esféricos situados en el interior de células del parénquima radial (floema) y de vasos; de modo que se ha estudiado cómo su cantidad y localización, así como la morfología de las células que contienen estos compuestos van a afectar a su eliminación (Back y Allen, 2000; Speranza *et al.*, 2007). En el caso de madera de eucalipto, la más usada en Europa, los ésteres de esteroides y esteroides libres constituyen la mayor parte de la fracción de extraíbles y dificultan la producción de papel pues entre otros sobreviven al proceso TCF (*Totally Chlorine Free*) de blanqueo en pastas kraft, uno de los más usados en la actualidad debido a su carácter respetuoso con el medio ambiente, siendo los responsables del *pitch* (Speranza *et al.*, 2007).

El *pitch* puede ser reducido mediante técnicas clásicas de control como el almacenamiento de las astillas de madera desde 6 meses a un año, periodo durante el cual los extraíbles de naturaleza lipofílica pueden llegar a disminuir hasta un 50% con una pérdida de biomasa del 2-5%. O bien, con técnicas de biocontrol como el “secado acelerado” de la madera con hongos seleccionados, siendo un claro ejemplo Cartapip™ (cepa albina de *Ophiostoma piliferum*) que pueden reducir el tiempo de almacenamiento a 2-3 semanas, aunque su éxito se centra en madera de coníferas no siendo posible su aplicación para frondosas (Farrel *et al.*, 1993). Por éste y otros motivos de índole económica se han tratado de buscar otras alternativas de biocontrol como puede ser el uso de crudos enzimáticos con actividad esteroles esterasa como el de *O. piceae* según se describe en (Calero-Rueda *et al.*, 2004).

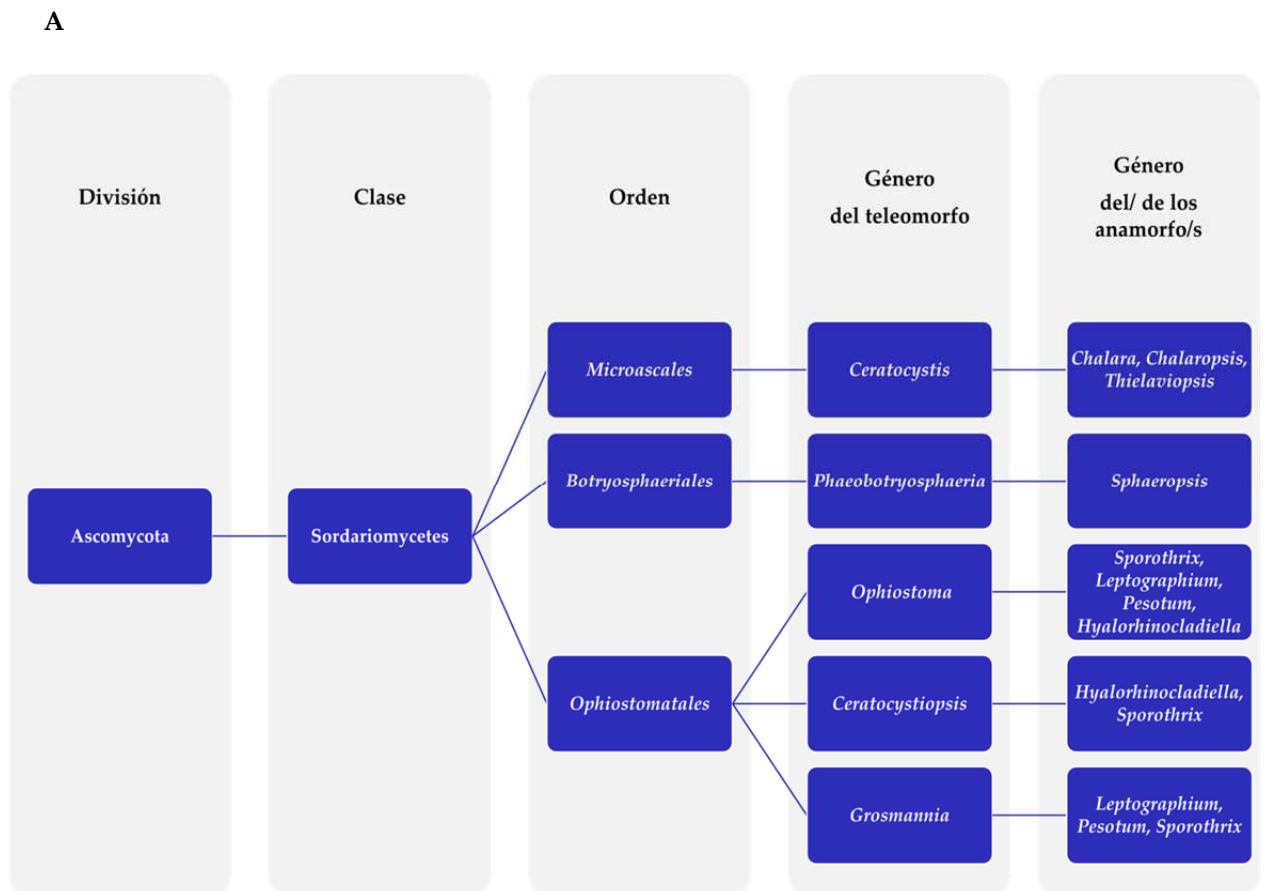
1.2. *Ophiostoma piceae*: EL HONGO PRODUCTOR DE LA ESTEROL ESTERASA

El género *Ophiostoma*, junto con los géneros *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis*, *Leptographium* [anamorfo de *Grosmannia* (Zipfel *et al.*, 2006)] y *Sphaeropsis* [anamorfo de *Phaeobotryosphaeria* (Phillips *et al.*, 2008)], constituyen los llamados hongos causantes del “azulado de la madera” que provoca grandes pérdidas económicas en el sector maderero. Se trata de hongos de la división *Ascomycota* (figura 1.3A) y todos ellos son morfológicamente muy similares por lo que su identificación ha sido muy dificultosa hasta el desarrollo de técnicas moleculares basadas en los marcadores ITS y ADN ribosómico 5,8S (Held *et al.*, 2003; Kim y Breuil, 2001; Paulin-Mahady *et al.*, 2002; Zipfel *et al.*, 2006).

Aunque son hongos dispersados principalmente por artrópodos y tienen una distribución global, recientemente en África se ha encontrado que pueden aparecer en infrutescencias de *Protea* spp. luego no están siempre asociados a insectos (Roets *et al.*, 2006). Árboles debilitados fisiológicamente, madera recién talada o aserrada, incluso madera en uso reblandecida pueden ser atacadas potencialmente por este tipo de hongos. Son organismos pioneros en la colonización de estos nichos que metabolizan los carbohidratos sencillos que se encuentran en las células de las traqueidas y el parénquima radial de la madera (Liese, 1970), así como ácidos grasos, triglicéridos y otros componentes de la madera (Blanchette *et al.*, 1992; Farrel *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995). El efecto del “azulado de la madera” se debe a la producción de gránulos de melanina y compuestos relacionados en el interior de las paredes de las células de las hifas; de modo que, según crece el hongo las hifas pigmentadas provocan una descoloración de la madera e incluso esos gránulos pueden ser liberados al exterior de las células (Blanchette *et al.*, 1992; Zink y Fengel, 1988). Aunque no causan ningún daño estructural de la madera y por tanto no comprometen sus propiedades mecánicas, al menos durante las primeras etapas de la colonización, sí que provocan una devaluación de ésta en el mercado para su uso para la producción de papel o “maderas tratadas” (Gorton *et al.*, 2004; Held *et al.*, 2003).

En la **figura 1.3B** se puede observar el ciclo general de vida de los escarabajos de la corteza y de los hongos asociados causantes del azulado: en un primer momento lo que ocurre es la dispersión de los escarabajos adultos por el medio llevando asociado en el exoesqueleto o en la micangia las esporas del hongo. Una vez elegido el árbol, el escarabajo comienza su ataque sobre éste y lo que hace es liberar feromonas para captar más individuos, esta fase suele durar unos 2-5 días, durante este tiempo en el caso de coníferas se producen mecanismos de defensa frente a la agresión que consisten en la formación de tubos de *pitch*. Llega un momento en el que los escarabajos dejan de emitir feromonas de atracción para liberar feromonas antiagregación, y así, evitar la sobreexplotación del árbol. Tras el ataque, los escarabajos comienzan con la fase de colonización para lo cual excavan túneles en la madera en donde van a depositar sus huevos, es en este momento cuando ocurre la inoculación de las esporas fúngicas en el floema de la planta, durante los primeros estadios larvarios del escarabajo el crecimiento del hongo es vegetativo (en forma micelial) y lento a lo largo del tejido conductor y comienza a penetrar en la madera aunque lentamente debido a que las defensas del árbol siguen siendo altas y existe mucha humedad y poco oxígeno. Con el tiempo los túneles larvarios son más largos y ramificados, y el floema y la madera comienzan a secarse a lo que se suma una bajada importante de las defensas químicas de las plantas, todo ello facilita la colonización por el hongo. Mientras tanto, las larvas continúan con su transformación y pasan a formar pupas en las cámaras de pupación previamente excavadas, es aquí donde el hongo comienza a producir esporas que recubren la superficie de estas cámaras y que servirán de alimento a los futuros nuevos escarabajos emergidos y las dispersarán por el ambiente adheridas en sus exoesqueletos o en la micangia (Six y Wingfield, 2011).

En la **figura 1.4** se muestra un cladograma con la posición de cada uno de los taxones del orden de los *Ophiostomatales* (Zipfel *et al.*, 2006); obsérvese que *O. piceae* queda en un subclado diferenciado del formado por especies de mayor virulencia como se indicará más adelante.



B

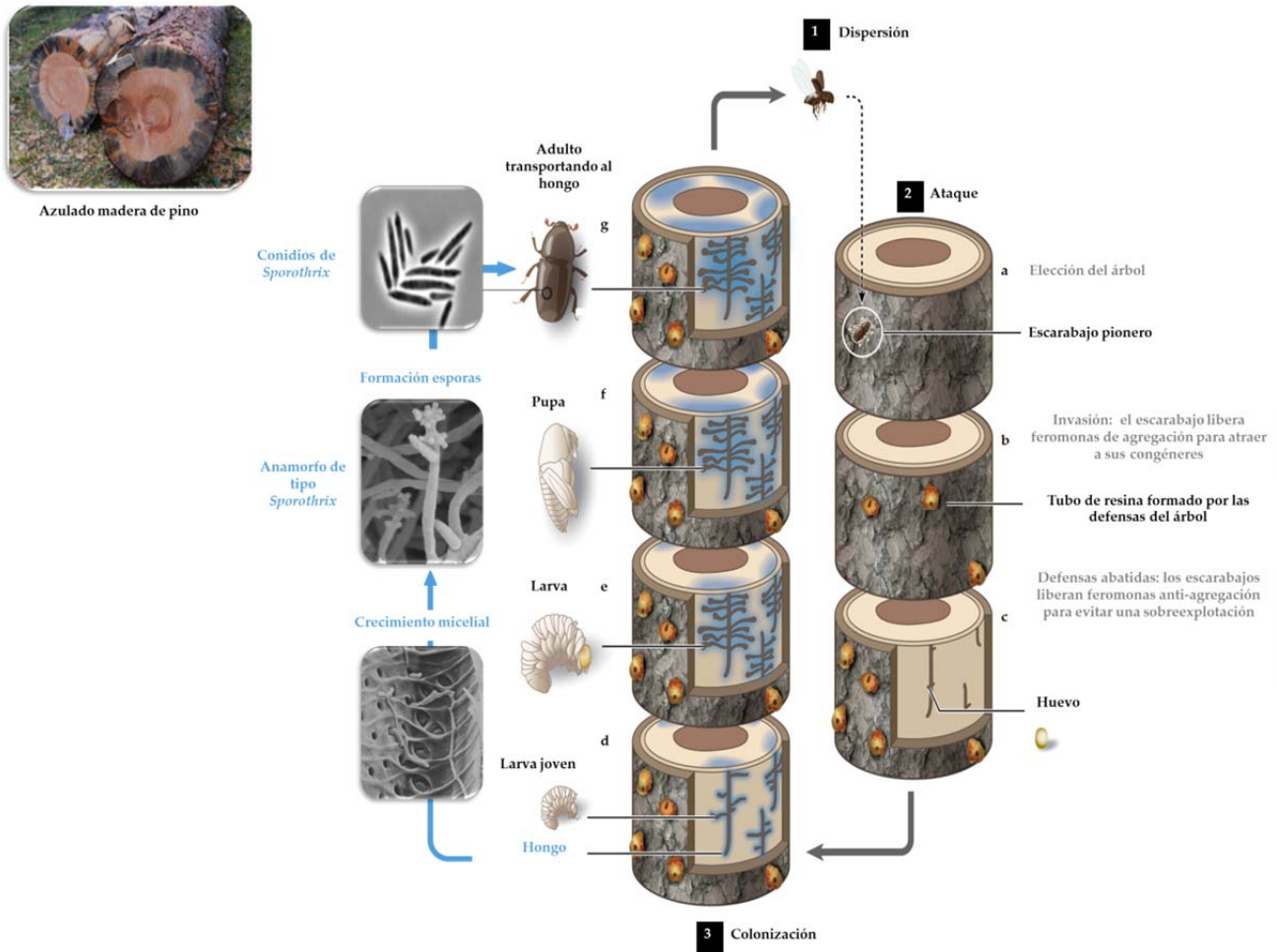


Figura 1.3. Hongos del azulado de la madera. Posición taxonómica, ver texto (A) y ciclo de vida asociado al vector (B), modificado de Six y Wingfield, 2011. Las micrografías correspondientes al anamorfo de tipo *Sporothrix* se han obtenido de Grobbelaar *et al.*, 2009, la micrografía del crecimiento en forma micelial de www.dutchelmldisease.org y la fotografía del azulado de la madera de Linnakoski *et al.*, 2012.

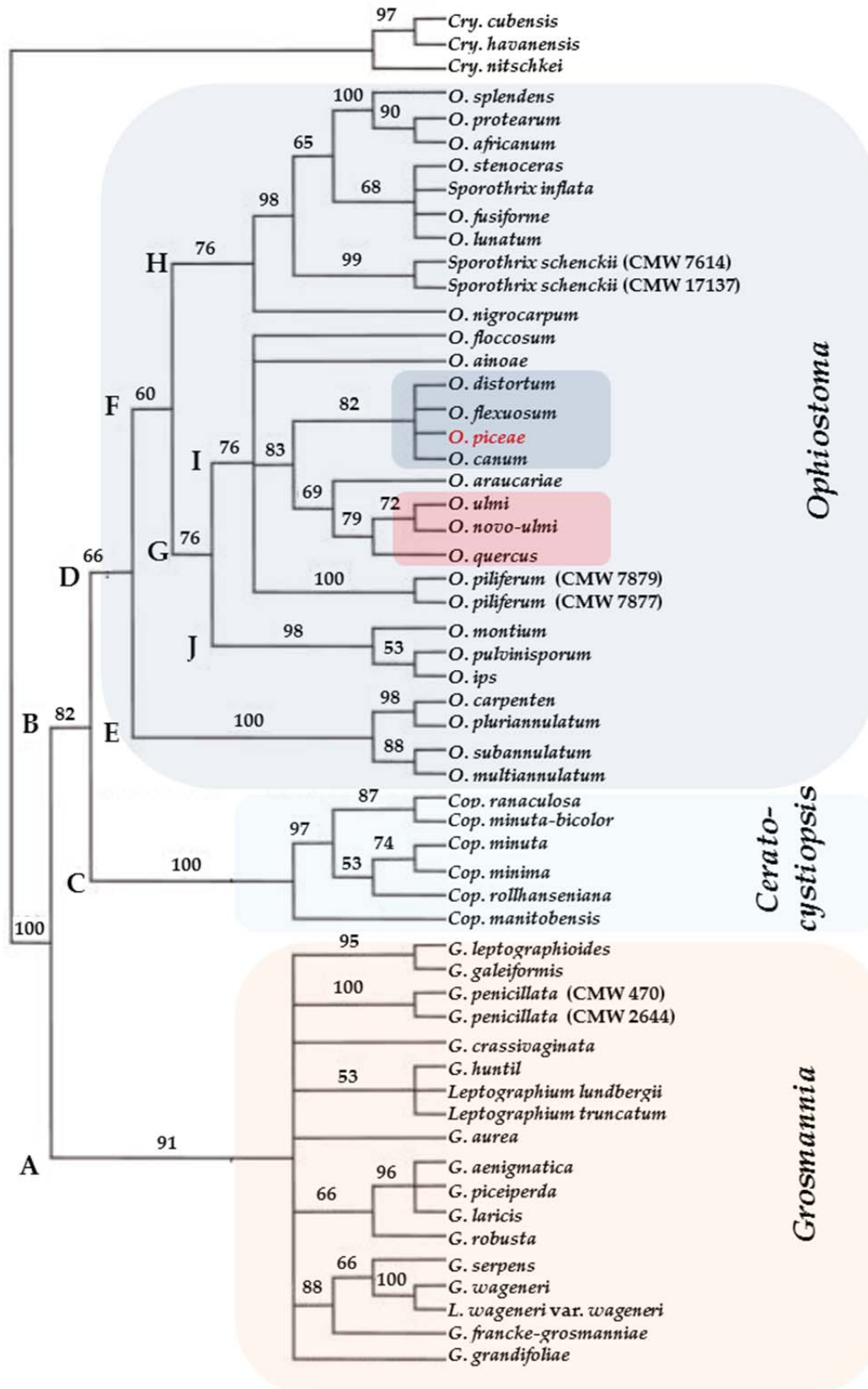


Figura 1.4. Cladograma del orden de los *Ophiostomatales*. Obtenido a partir de cuatro árboles analizados por el método de la máxima parsimonia con el algoritmo TBR usando una búsqueda heurística sobre el conjunto de los datos obtenidos de las secuencias parciales de LSU (secuencia de la subunidad grande del ADN ribosomal nuclear) y β -tubulina. El árbol se enraizó utilizando tres especies de *Cryphonectria* (*Cry.*) Adaptado de Zipfel *et al.*, 2006.

-Introducción-

Ophiostoma da nombre al teleomorfo o forma perfecta, siendo las formas anamorfos o imperfectas *Sporothrix*, *Hyalorhinocladiella*, *Leptographium* y *Pesotum* (Zipfel *et al.*, 2006).

Ophiostoma piceae da nombre a un complejo dentro del cual se pueden distinguir 9 especies que a su vez según un estudio filogenético basado en sus regiones ITS se pueden dividir en dos clados: uno en el que el azulado de la madera se produce principalmente en hospedadores de tipo coníferas y está formado por las especies *O. piceae*, *O. canum*, *O. floccosum* y *O. setosum*; y otro en el que se produce en frondosas constituido por *O. querci*, *O. catonianum*, y los hongos responsables de la grafiosis del olmo: *O. ulmi*, *O. novo-ulmi* y *O. himal-ulmi* (Harrington *et al.*, 2001). Las especies de este complejo se distribuyen principalmente por el hemisferio Norte y es de donde se consideran nativas aunque en el Sur también se ha descrito la presencia de *O. quercus* pero no la de *O. piceae* (de Beer *et al.*, 2003).

O. piceae (Münch) Syd. & P. Syd. (Sydow y Sydow, 1919) *sensu stricto* (figura 1.5) se puede encontrar a lo largo del planeta sobre la madera de la mayor parte de las coníferas (pino, picea, abeto, etc. de diferentes especies todos ellos) sin que *a priori* existan subpoblaciones “específicas” de un tipo u otro de conífera aunque mostrando todas ellas una gran diversidad génica y genotípica aunque con baja diferenciación genética lo cual parece ser típico de especies fúngicas que se reproducen sexualmente y también tienen una gran diversidad fenotípica según el grado de pigmentación que muestran. En cuanto a su ciclo de vida, permanece como haploide durante la mayor parte de este y se puede reproducir tanto asexual como sexualmente a través de sinemata y peritecios respectivamente. Es heterotálico, es decir, presenta dos tipos de células “apareantes” denominadas A y B. Se le puede considerar indígena de Canadá o introducido muy tempranamente con los primeros asentamientos europeos desde diferentes partes.

O. piceae es un hongo saprófito causante del “azulado de la madera” durante su almacenamiento. Factores diferentes pueden favorecer el crecimiento del hongo sobre ella como cortes, heridas provocadas por insectos, etc. Parece ser transportado de manera indiscriminada por diferentes vectores como ácaros, nematodos e insectos (Gagné *et al.*, 2001). En España se ha detectado la presencia del hongo asociado a diferentes especies de escarabajos de la corteza que infectan *Pinus radiata* en la zona del País Vasco siendo interesante el hecho que estas asociaciones no habían sido detectadas previamente en otros lugares (Romón *et al.*, 2007).

Aunque a primera vista este ascomiceto pueda parecer un total desconocido existen un gran número de artículos sobre él y en Canadá es el foco de atención de distintos proyectos debido a las importantes pérdidas económicas que acarrea (Bernier *et al.*, 2004). Recientemente, en el año 2013, se ha secuenciado su genoma, que con un tamaño de 33 Mpb y una cantidad de 8.884 genes predichos es similar en talla y contenido en genes al de otros ascomicetos. Presenta un contenido en GC del 52,8% y el tamaño medio de las secuencias codificantes de los genes es de 1.401 pbs. De las 8.884 proteínas predichas 8.723 tienen una longitud de al menos 100 aminoácidos, una tercera parte de los genes (3.026) tienen sólo un exón y sólo 1.283 transcritos son codificados por cuatro o más exones. Se trata de un genoma compacto en el que los genes, sin incluir sus UTRs, representan un 45% del ensamblaje. De los análisis del genoma se ha establecido que unas 778 secuencias codificantes lo son para proteínas que se secretan. Además, se han identificado los genes responsables de la síntesis de melanina y también los genes y rutas para el uso y crecimiento sobre fuentes de carbono sencillas y la albura de la madera, que es su sustrato natural, donde sólo penetra los 2 ó 3 cms más superficiales, a diferencia de otros ophiostomatoides; así como, genes involucrados en la detoxificación de terpenos y compuestos fenólicos (Haridas *et al.*, 2013).

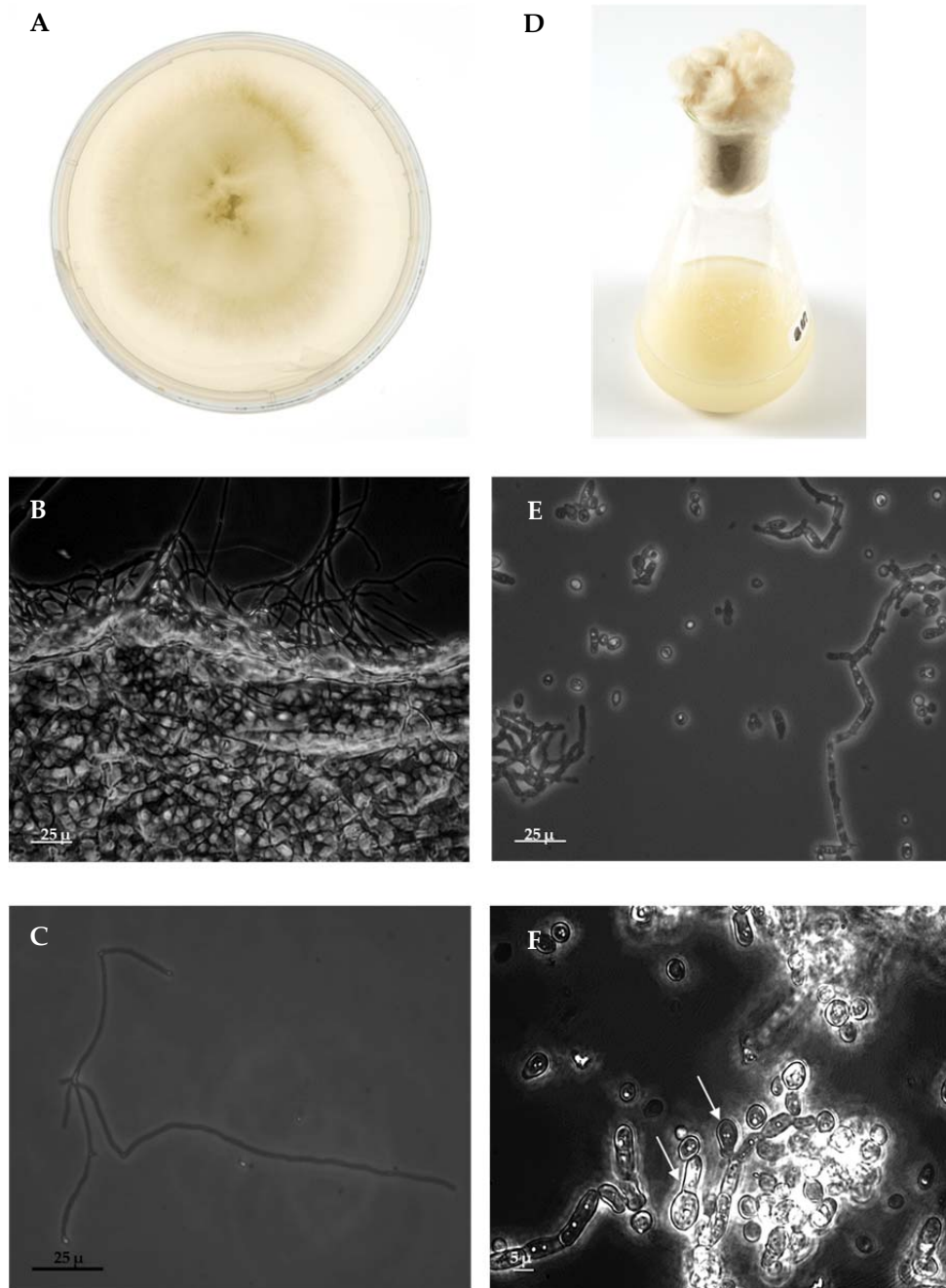


Figura 1.5. Dimorfismo de *O. piceae*. Crecimiento en forma micelial en medio agar malta (A), se observan zonas de melanización. Micrografías de contraste de fases del micelio crecido en medio sólido (B y C), se observan hifas cilíndricas. Crecimiento en forma levaduriforme en medio Czapek-Dox modificado (D). Micrografías de contraste de fases del hongo crecido en medio líquido (E y F), se observa la forma mayoritaria levaduriforme (blastosporas) y la presencia de pseudohifas. Las flechas indican blastosporas en proceso de elongación y crecimiento apical. Micrografías tomadas con una Cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX sobre microscopio óptico Zeiss Axioplan.

1.3. ESTEROL ESTERASAS

Las esterol esterasas (EC 3.1.1.13) son enzimas que se encargan en las condiciones adecuadas de hidrolizar ésteres de esterol. Posiblemente, la más conocida y estudiada sea la colesterol esterasa de mamíferos pero dentro del mundo microbiano existen enzimas bastante interesantes desde un punto de vista biotecnológico en las que se ha descrito esta actividad. Además son capaces de hidrolizar otros sustratos típicos de lipasas (EC 3.1.1.3), aunque esta nomenclatura se refiere típicamente a triacilglicerol hidrolasas, y de esterasas (EC 3.1.1). Todas ellas son asimismo capaces de catalizar reacciones de síntesis cuando las condiciones son propicias, esto es en medio orgánico.

Se han descrito un gran número de este tipo de enzimas y muchas se han cristalizado, de hecho, los primeros estudios de cristalización de lipasas se centraron en las de procedencia fúngica hace ya más de 50 años (Cygler *et al.*, 1992), gracias a esto se ha inferido una estructura general para todas ellas (Pleiss *et al.*, 2000). Aunque sus estructuras primarias sean diferentes comparten una estructura general basada en la organización de las enzimas del grupo de las hidrolasas, lo cual evidencia su origen evolutivo divergente común. Dicha estructura se basa en el “armazón” de tipo α/β -hidrolasa que se describe a continuación: (Carr y Ollis, 2009; Lotti y Alberghina, 2007):

1.3.1. Plegamiento α/β

Como su nombre indica, la estructura está formada por un núcleo con plegamiento de tipo α/β de modo que canónicamente se encontraría formado por ocho láminas β , siendo la segunda antiparalela al resto, y conectadas entre sí por zonas de hélice α salvo las dos primeras (**figura 1.6A**). Cada una de las hélices presenta un giro superhelicoidal haciendo que la primera y última lámina del núcleo sean ortogonales entre sí. Este plegamiento presenta cierta modularidad (**figura 1.6B y C**) lo que quiere decir que se pueden dar cambios en la secuencia canónica que puede ser modificada con diferentes motivos estructurales, en tamaño y posición (permutaciones), que si bien no afectan a la estructura secundaria ni terciaria sí que les confieren propiedades para el reconocimiento y catálisis de determinados sustratos e incluso propiedades no catalíticas. Esta modularidad podría explicar cierta transferencia horizontal de genes con intrones desde eucariotas a procariotas (Marchot y Chatonnet, 2012; Ollis *et al.*, 1992).

Dentro de la superfamilia hay enzimas sin actividad hidrolasa y proteínas que carecen de actividad enzimática pero la denominación se mantiene en base a su estructura y desde un punto de vista histórico. La dienolactona hidrolasa (DLH) es el arquetipo de este tipo de enzimas por ser su estructura próxima a la canónica (Carr y Ollis, 2009).

En el caso concreto de las lipasas, a diferencia de la estructura canónica en la que el residuo ácido catalítico (Asp o Glu) se encuentra tras la séptima lámina β , éste está tras la sexta (**figura 1.6B**) lo que es un caso de migración de un residuo durante la evolución de estas proteínas (Marchot y Chatonnet, 2012) aunque en la lipasa de *Geotrichum candidum* (**figura 1.6C**) la mantiene en la lámina 7 que es la canónica (Todd *et al.*, 2002). Entre las diferentes lipasas se puede observar una gran diferencia en tamaño, sin embargo el núcleo de todas ellas es prácticamente el mismo, las únicas diferencias que se pueden encontrar son las extensiones N y C-terminales (hélices adicionales) y en la longitud de los bucles entre las hélices α de la lámina β central que se extienden principalmente por el lado C-terminal de aquella formando una tapa sobre el sitio activo; mientras las extensiones que salen por la cara N-terminal son más cortas. Estas diferencias podrían desempeñar algún papel en la unión al sustrato y en las interacciones en la interfase agua-lípido (Cygler *et al.*, 1992). Con respecto al esquema canónico existen otras estructuras con diferencia en el número de láminas beta, la presencia de inserciones e incluso variaciones en la arquitectura de los subdominios de unión al sustrato.

No todas las esterol esterasas forman parte de este grupo pues en algunas existen peculiaridades respecto a su ensamblaje presentando una diada en vez de la típica triada. Ejemplos de esto son las lipasas/esterasas de *Streptomyces* que muestran un sitio activo diferente en posición al canónico. En estos

-Esterasa versátil-

casos en lugar del residuo ácido de la típica triada se emplea el oxígeno carbonílico próximo para estabilizar la histidina catalítica (Carr y Ollis, 2009).

Pese a su estructura secundaria y terciaria común, los miembros de esta superfamilia perdieron la similitud de sus secuencias durante la selección natural y especialización a partir de un ancestro común para así operar sobre varios sustratos con diferentes estructuras y propiedades físico-químicas (Suplatov *et al.*, 2012).

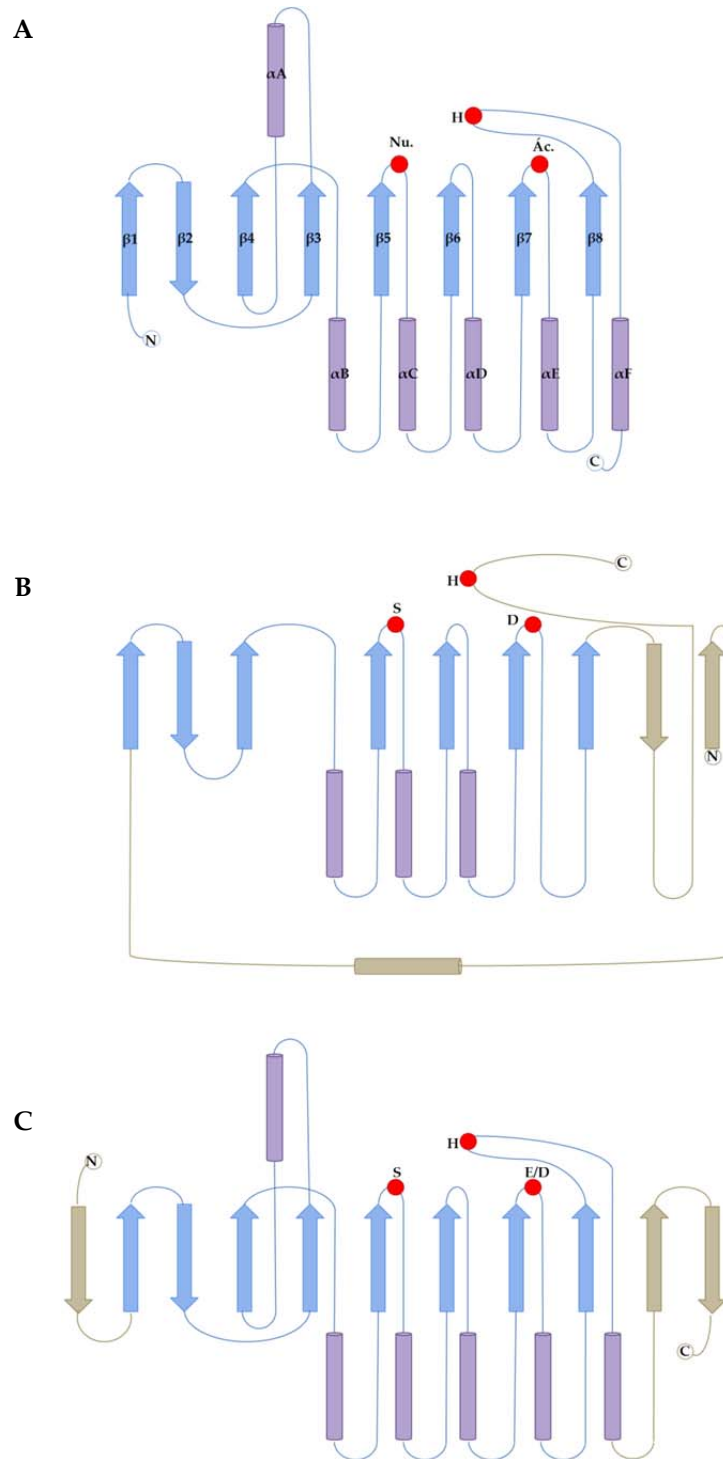


Figura 1.6. Representación de la estructura secundaria de las hidrolasas. Plegamiento canónico de tipo α/β (A). Diagramas de variaciones en la estructura anterior dentro de la familia de las α/β -hidrolasas: lipasas fúngicas del tipo de la de *Humicola lanuginosa* (B) y de lipasas fúngicas de gran tamaño del tipo de las de *G. candidum* o la colesterol esterasa bovina (C). Modificado de Heikinheimo *et al.*, 1999.

1.3.2. Sitio de unión del sustrato

1.3.2.1. Triada catalítica

La triada catalítica es una disposición particular de aminoácidos que comprende un nucleófilo, un residuo ácido y una histidina, que probablemente ha surgido varias veces en la evolución; de hecho, se encuentra en proteínas tan diferentes como las α/β -hidrolasas y las serín-proteasas, seguramente debido a una evolución convergente (Carr y Ollis, 2009; Ollis *et al.*, 1992). Si bien la encontrada en esterasas, lipasas y esteroles esterasas es funcionalmente como la de proteasas del tipo de la tripsina o subtilisina, estructuralmente difiere por el orden de los residuos implicados (Arpigny y Jaeger, 1999).

El nucleófilo más común de la familia es la serina, siendo en este orden Ser-Asp-His la triada catalítica. En las esterasas de alto peso molecular y varias lipasas; así como, muchas esteroles esterasas la triada se modifica a Ser-Glu-His (Carr y Ollis, 2009). La serina se encuentra encerrada o rodeada en una secuencia consenso que forma el llamado bolsillo nucleofílico (Carr y Ollis, 2009). Esta configuración patrón general suele consistir en el pentapéptido Gly-X-Nu-X-Gly. Con el establecimiento de la existencia del pentapéptido consenso en las secuencias conocidas de las enzimas de la familia se comenzó a usar como paradigma para la identificación de la serina catalítica de la triada en las nuevas proteínas que iban apareciendo. Hasta ese momento, década de los años ochenta, la identificación de esta serina se había hecho mediante su marcaje con ácido butil-borónico o inhibidores específicos como la tetrahidrolipstatina en enzimas como las lipasas hepáticas y pancreáticas; así como mediante secuenciación aminoacídica y mutación dirigida (Cygler *et al.*, 1992).

En cuanto a los otros dos residuos de la triada, el residuo ácido y la histidina, suelen encontrarse en un bucle que contiene dos giros inversos al final de las láminas $\beta 7$ y $\beta 8$ respectivamente (Carr y Ollis, 2009) (figura 1.6A).

Aunque la triada catalítica es importante para la catálisis enzimática, los estudios realizados durante los años setenta por Henderson sobre la estructura tridimensional de la quimotripsina unida al imidazol de indolacrilato sugirieron por primera vez la existencia de otros elementos estructurales, como el agujero oxianiónico, importantes para la catálisis en las enzimas de tipo hidrolasa; y que por tanto, su actividad no recaería exclusivamente en el papel de la triada catalítica (Henderson, 1970).

1.3.2.2. Bolsillo nucleofílico

Es la característica más conservada del plegamiento de tipo α/β al residir en él la funcionalidad de la proteína. Se trata de un giro muy marcado dentro de un giro de vuelta de hélice de la lámina $\beta 5$, que fuerza al nucleófilo a adoptar en su cadena principal ángulos de torsión $\Phi=60^\circ$ y $\Psi=-110^\circ$ que son inusuales (Lotti y Alberghina, 2007). De una manera más sencilla, se puede decir que es un giro de tipo γ con el nucleófilo en su ápice (Carr y Ollis, 2009). Precisamente, el giro tan brusco que supone dentro de la estructura explicaría que se encontrara en la secuencia consenso rodeado de glicinas en las posiciones Nu-2 y Nu+2 del nucleófilo al tratarse éstas de un residuo que configura ángulos de tipo diédrico, no ramachandran y de cadena lateral pequeña (al ser carente de sustituyente). Además, el residuo en posición Nu+3 también ha de ser pequeño para evitar impedimentos con la lámina $\beta 4$. Esta configuración es la que permite identificar el nucleófilo en la secuencia (Carr y Ollis, 2009). Según (Ollis *et al.*, 1992) dicha configuración del nucleófilo permite exponer la cadena corta de éste, proyectándola fuera de la estructura haciéndola fácilmente accesible a la histidina catalítica y al sustrato. El eje de la hélice que sigue al nucleófilo se dirige a lo largo del canal de acceso al sustrato, lo que es importante pues esta configuración puede crear un momento dipolar que ayuda a estabilizar al intermediario tetraédrico junto con el papel que ya de por sí desempeña el agujero oxianiónico (Hol *et al.*, 1978).

1.3.2.3. Agujero oxianiónico

La geometría del bolsillo nucleofílico le permite una aproximación cercana al sustrato y formar parte del “agujero oxianiónico”. Éste se encuentra, generalmente, formado por dos átomos de nitrógeno del esqueleto de la proteína. El primero siempre forma parte del residuo inmediatamente siguiente al nucleófilo, el segundo de un residuo situado entre la lámina $\beta 3$ y la hélice αA . En la mayoría de los casos, el agujero se puede observar preformado en enzimas en estado de reposo pero en otros es necesaria la unión del sustrato para su activación o la apertura de la tapadera, en el caso de que esté presente. El agujero oxianiónico recibe su nombre porque se encarga de la estabilización del intermediario tetraédrico formado durante la reacción de hidrólisis. Éste no es más que un estado transitorio del sustrato cargado negativamente, concretamente la carga negativa se encuentra en el átomo de oxígeno carbonílico del enlace que va a ser cortado; de modo que, mediante enlaces de hidrógeno con los grupos NH de los residuos anteriormente especificados queda estabilizado (Carr y Ollis, 2009; Lotti y Alberghina, 2007).

Ya en los años 90 se describieron en la lipasa de *C. rugosa* que las amidas del esqueleto proteico correspondientes a los residuos Gly123, Gly124 y Ala210 se encontraban formando puentes de H con un inhibidor que mimetizaba la estructura del intermediario tetraédrico y que debían ser residuos importantes para la catálisis enzimática (Beer *et al.*, 1996). Posteriormente, se ha descrito la existencia de dos posibles tipos de agujero oxianiónico: uno de tipo GX y otro del tipo GGGX. Se ha postulado que la existencia de un tipo u otro de agujero, más que la presencia o no de tapadera, sería responsable de la diferente especificidad de sustrato y permitiría diferenciar entre las distintas esterases en sentido amplio. De este modo, el primer tipo de agujero sería propio de carboxilester-lipasas mientras que el segundo se ajustaría más a carboxilesterasas (Pleiss *et al.*, 2000).

En el caso concreto de lipasas/esterol esterases el sitio activo, que presenta las características descritas, se encuentra alojado en el interior de la estructura de la proteína y el sustrato accede a él a través de un sitio de unión localizado en un bolsillo sobre la lámina β central. Independientemente de la estructura similar que muestran todas las enzimas de este tipo, sus regiones de unión del sustrato son considerablemente diferentes en longitud, forma, estructura y propiedades físico-químicas, especialmente en cuanto a la apolaridad de los residuos que cubren la zona del bolsillo (Lotti y Alberghina, 2007). Así, mientras que en la lipasa de *C. rugosa* es lo suficientemente larga como para alojar una cadena de 18 átomos de carbono, en la de *Rhizopus miehei* esta región es una leve depresión sobre la superficie (Kazlauskas, 1994). Esas características del bolsillo dependen, entre otras, de preferencias en cuanto a la longitud de la cadena acilo (Pleiss *et al.*, 1998), lo que se ha demostrado mediante la generación de mutantes en residuos ocupando distintas posiciones a lo largo del bolsillo con diferentes enzimas como la de *C. rugosa* (Lotti y Alberghina, 2007).

Del estudio computacional realizado en los años noventa de los sitios de unión al sustrato de las lipasas de *R. miehei* y *C. rugosa* se puede hablar de la presencia de dos zonas bien diferenciadas (Norin *et al.*, 1994): i) una con gran afinidad por grupos alifáticos donde se unirían las cadenas de ácidos grasos y ii) otra hidrofílica, opuesta a la anterior, importante para la actividad hidrolítica de la enzima pues puede acomodar una molécula de agua en una posición que es favorable para un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del grupo acilo. Además, en tal posición la molécula de agua podría formar un puente de hidrógeno con el imidazol de la triada catalítica que actúa como base durante la catálisis.

La caracterización de esta zona o sitio de unión al sustrato se ha realizado también mediante el estudio de la unión covalente de análogos del estado de transición a diferentes lipasas. Se han empleado fosfonatos que imitan el estado de transición para la acilación y sulfonatos que imitan para la desacilación (Kazlauskas, 1994). Se ha podido comprobar así que la estructura tridimensional de la región del centro activo de la colesterol esterase pancreática, la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica* y la de las lipasas de *C. rugosa*, *G. candidum* y de distintas especies de *Pseudomonas* presentan una alta homología (Chiou *et al.*, 2005). Los estudios de Beer *et al.* de 1996 sobre las propiedades cinéticas de mutantes de la lipasa de *Rhizopus oryzae*, ciñéndose más a cambios de K_m que de k_{cat} (por apuntar cambios del centro activo)

-Introducción-

permitieron sugerir la existencia de zonas en la proteína donde se estabilizaba el sustrato distintas en el clásico bolsillo hidrofóbico (Beer *et al.*, 1996). Se podrían establecer al menos cinco zonas o sitios principales de unión en el centro activo de estas enzimas (**figura 1.7**): i) una zona de unión de la cadena acilo del sustrato (ABS), ii) el agujero oxianiónico (OAH) que permite estabilizar al intermediario tetraédrico y que engloba el llamado sitio de unión hidrofílico del grupo saliente (LHIS) que acomoda la parte más hidrofílica de dicho grupo, iii) el sitio “esterático” (ES) que comprende la triada catalítica encargada de la catálisis ácido-base; y por ello, de atacar al éster carbonílico a través de la serina nucleofílica, iv) el sitio de unión del grupo saliente (LBS) que comprendería una zona más hidrofóbica (LHOS) o/y el sitio de unión de la segunda cadena acilo (SACS) que une la parte colesterol de la molécula de éster de colesterol o la segunda cadena de ácido graso de un triacilglicérido. Este sitio LBS se trata de una cavidad con forma de grieta situada por encima del centro activo y en dirección opuesta al sitio ABS y en ella sólo los cinco primeros átomos de la cadena de ácido graso quedan bien ordenados (Chiou *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1999).

De los estudios de Lang *et al.* con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Lang *et al.*, 1998) se ha podido ver que el sitio ABS es una cavidad hidrofóbica bien definida encargada de alojar la cadena *sn*-3 de sustratos tipo triacilglicéridos; mientras que el sitio SACS, como su nombre indica, acomoda la cadena en posición *sn*-2. En este último sitio, se pueden distinguir dos zonas: un parche hidrofílico al final de la cavidad donde se une la parte del enlace éster y un gran parche hidrofóbico que se dirige hacia la superficie de la proteína donde se une la parte más hidrofóbica de la cadena *sn*-2, según lo descrito previamente estas zonas podrían corresponderse con los sitios LHIS y LHOS, respectivamente. El sitio para la cadena *sn*-1 se trataría de una cavidad pequeña y ligeramente hidrofóbica en la que los residuos que la recubren interaccionan poco con la cadena acilo. De este modo, este tipo de sustratos adquiere una conformación en tridente que se caracteriza por presentar ángulos diédricos θ_2 (O5-C2-C3-O3) y θ_4 (O1-C1-C2-O5) de 89 y 81°, respectivamente, haciendo que la cadena acilo en posición *sn*-2 apunte al interior de la estructura enzimática. En el caso de las enzimas producidas por los miembros de la familia *Pseudomonadaceae* la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad de los sitios ABS y SACS varía y podría explicar las diferentes regio y enantioselectividades. Otros estudios aseguran que el bolsillo hidrofóbico que aloja la cadena acilo en posición *sn*-2 sería el que contribuiría mayoritariamente a la estéreo-preferencia de la enzima; de hecho, se ha visto cómo la histidina catalítica forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno del enlace éster de la cadena en posición *sn*-2 del sustrato (Kazlauskas, 1994; Lang *et al.*, 1998; Lotti y Alberghina, 2007). Asimismo, el uso de inhibidores de tipo diastoméricos ha demostrado la estereoselectividad en la zona ABS de la colesterol esterasa pancreática (Chiou *et al.*, 2005).

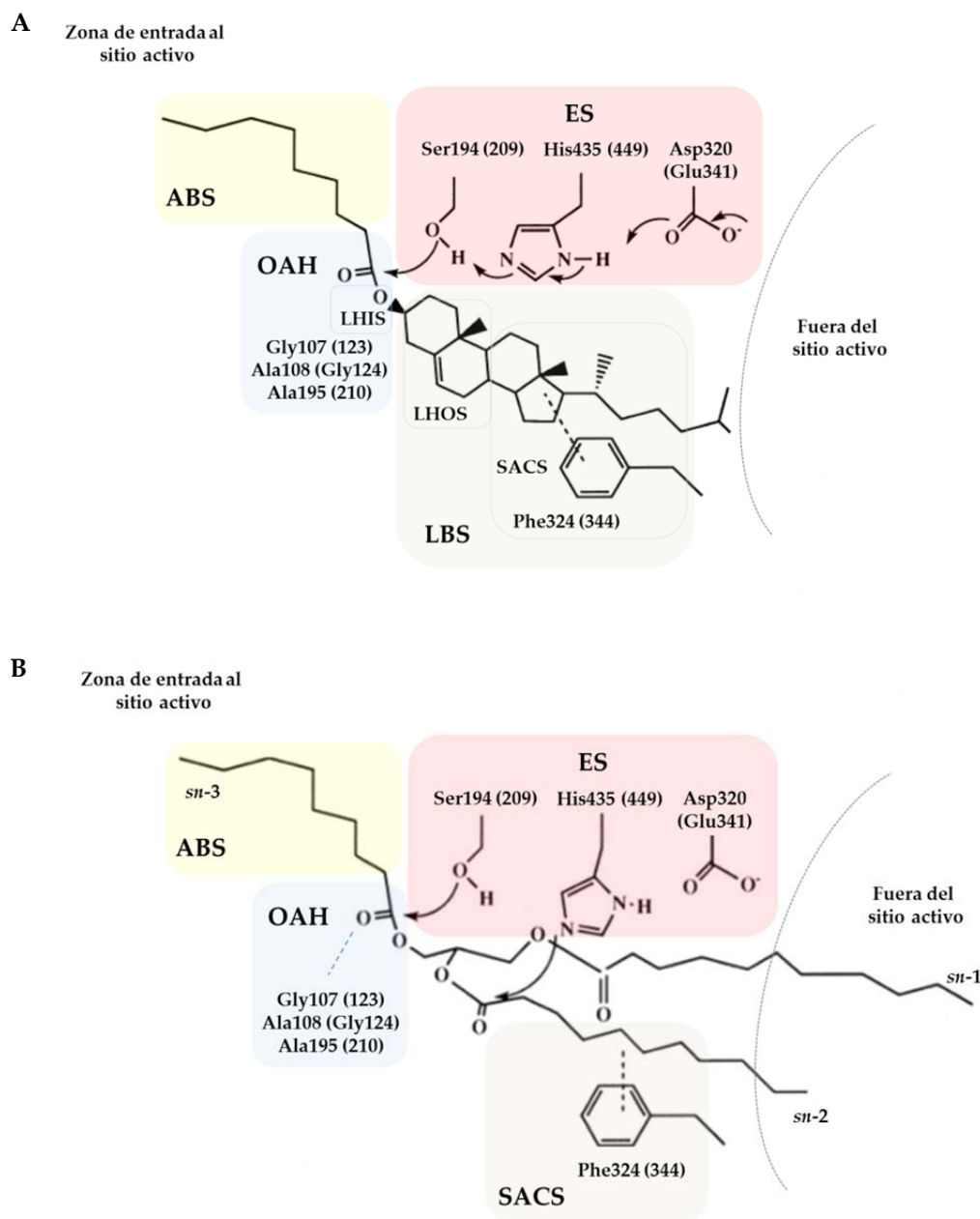


Figura 1.7. Interacciones posibles entre sustratos y los residuos que configuran el centro activo de la enzima. Ésteres de colesterol (A) y triacilglicérido (B). Los residuos especificados hacen referencia a la colesterol esterasa pancreática y aquellos entre paréntesis a los equivalentes en la lipasa de *C. rugosa*. Modificado de Lin *et al.*, 1999.

1.3.2.4. Anatomía diferencial de los sitios de unión en las lipasas: el sitio ABS

En 1998, Pleiss y colaboradores estudiaron diferentes lipasas y serín-esterasas para comprender en qué radicaba la base molecular de sus especificidades de sustrato (Pleiss *et al.*, 1998). Si bien, todas ellas presentaban una arquitectura y mecanismo de catálisis similares, pues en todas ellas el sitio de unión del sustrato se encuentra alojado dentro de un bolsillo en lo alto de la lámina central β rodeado de una zona altamente hidrofóbica que interactúa con la interfase hidrofóbica del sustrato, diferían en sus

-Introducción-

especificidades por el sustituyente acilo. Comprobaron que lipasas y esterases difieren en el tamaño de esta zona hidrofóbica de interacción con el sustrato, así como en forma, profundidad y propiedades físico-químicas. Se describió que las lipasas presentan un gran sitio de unión de naturaleza hidrofóbica para el grupo acilo; mientras que las esterases presentan un bolsillo de pequeñas dimensiones para dicho grupo que encaja perfectamente con la longitud de los sustituyentes de sus sustratos favoritos.

Así, las lipasas se pudieron subdividir en tres grupos en función de su geometría (Pleiss *et al.*, 1998): i) aquellas con una zona de unión hidrofóbica parecida a una grieta con forma de cuenco poco profunda en la superficie de la proteína como ocurre con las lipasas de *Rhizopus* y *Rhizomucor*, ii) aquellas que presentan un sitio de unión con forma de embudo como ocurre en la lipasa de *C. antarctica*, *Pseudomonas*, la cutinasa y la lipasa pancreática de mamíferos y iii) las que presentan un sitio de unión con forma de túnel en el interior de la proteína con una gran entrada hacia la derecha, vista la proteína de lado, como en el caso de la de *C. rugosa* (**figura 1.8**).

En el caso concreto de la enzima de *C. rugosa* ya se mencionaba, en los estudios realizados en los años noventa, la existencia de un gran túnel que no estaba presente en otras enzimas caracterizado por la presencia de una zona de unión de grupos alifáticos y de zonas afines al agua en el centro activo de la enzima y entre la tapadera y el núcleo de la enzima. Se trataría de una organización anfifílica donde la zona hidrofílica podría dirigir las moléculas de agua desde la fase acuosa o la zona de solvatación hasta el centro de reacción (Norin *et al.*, 1994). Según los datos obtenidos (Pleiss *et al.*, 1998) este túnel tiene al menos una longitud de 22 Å con un diámetro de 4 Å. El túnel está formado por los residuos Gly124 (agujero oxianiónico), Phe125, la serina catalítica Ser209, Ala210 (agujero oxianiónico), Met213, Val245, Pro246, Phe296, Ser301, Leu302, Arg303, Leu304, Leu307, Phe345, Tyr361, Phe362, Ser365, Phe366, Val409, Leu410, Leu413, Gly414, Phe415, Phe532 y Val534; de modo que, la serina catalítica queda justo detrás de la entrada al túnel que se estrecha a la altura del carbono C3 del sustrato contactando así íntimamente con la cadena acilo hasta su extremo ω (extremo metilo). Las zonas más hidrofóbicas del túnel se localizan desde el C4 al C7 y del C12 al C14 y a diferencia de otras lipasas la zona de unión del alcohol no se encuentra limitada por la estructura de la proteína a modo de muro. Vista la molécula desde arriba, la tapadera se ve en el lado inferior derecho; desde una vista lateral, se puede ver cómo el sustrato accedería al sitio de unión desde el lateral derecho (**figura 1.8C**). Posteriormente, los estudios cristalográficos de la LIP2 de *C. rugosa* corroboran tal situación (Mancheño *et al.*, 2003).

Pese a que la forma de sus sitios de unión del grupo acilo refleja su especificidad de sustrato existen otros factores que determinan ésta como determinados residuos del centro activo y la tapadera; así como, en solventes orgánicos, la actividad de agua, la calidad de la interfase o superficie de contacto con el sustrato, o el soporte en caso de inmovilización (Pleiss *et al.*, 1998).

Si bien la maquinaria catalítica de estas enzimas es común, la forma de unirse al sustrato varía totalmente de unas a otras; aunque en la mayoría, la unión de aquel ocurre en primera instancia a nivel de una estructura conocida como tapadera situada justo por encima de la triada catalítica (Carr y Ollis, 2009).

-Esterasa versátil-

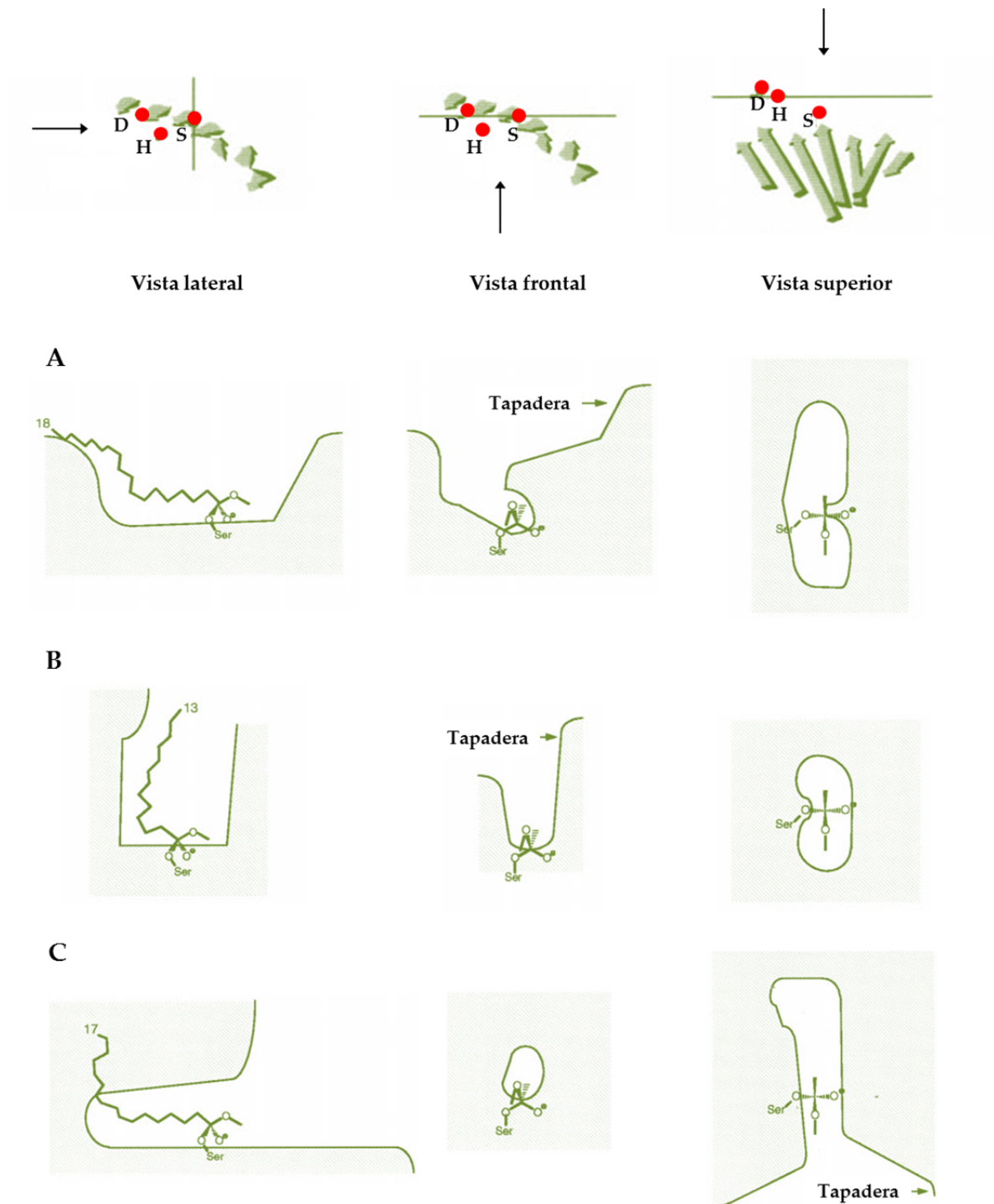


Figura 1.8. Forma del sitio de unión de lipasas. Se puede apreciar la orientación de secciones que son planos perpendiculares al plano de la hoja y se indican con una línea recta. La dirección de la vista se indica con una flecha. Vistas lateral, frontal y superior de las lipasas de *R. miehei* (A), *C. antarctica* (B) y *C. rugosa* (C). Por claridad sólo se muestra el sustituyente acilo del sustrato de tipo éster. El número en él hace referencia a la longitud del sustituyente más largo que se puede unir completamente al bolsillo (Pleiss *et al.*, 1998).

1.3.3. La tapadera

Durante los años noventa la obtención de diversas estructuras cristalográficas de lipasas como las de *R. miehei*, *H. lanuginosa* y *C. rugosa* permitió observar la existencia de grandes zonas hidrofóbicas expuestas de la proteína que se suponían interaccionarían con la interfase lipídica (Beer *et al.*, 1996). Esta estructura llamada tapadera, de presentarse, está formada por péptidos que surgen de los extremos C-terminales de las láminas $\beta 4$, $\beta 6$, $\beta 7$ o $\beta 8$. En función del tamaño de los dominios que la forman se pueden observar diferencias en la masa molecular de las distintas proteínas de la familia (Carr y Ollis, 2009).

En el caso de las lipasas, cuando se encuentran en conformación cerrada la tapadera se encarga de cubrir el sitio activo haciéndolo inaccesible al sustrato; mientras que, durante la transición a su conformación abierta es cuando se desplaza dejando al descubierto el túnel de entrada para el sustrato. Además, debido a su carácter anfipático, mientras que está cerrada presenta residuos hidrofílicos hacia el exterior pero una vez abierta lo que expone son residuos hidrofóbicos aumentando así la superficie apolar en la zona de entrada del sustrato favoreciendo la unión de éste. Muchos estudios han demostrado el papel de la tapadera en la selectividad de las lipasas/esterol esterasas hacia determinados sustratos. Por ejemplo, la realización de quimeras de isoenzimas de *C. rugosa* permitió ver cómo la LIP1 con la tapadera de LIP2 o LIP3 (que son esteroles esterasas) aumentaba su actividad frente a linoleato de colesterol. Su papel no se fundamentaría sólo en la secuencia de aminoácidos sino también en su conformación y flexibilidad a la hora de interaccionar con el sustrato (Brocca *et al.*, 2003; Lotti y Alberghina, 2007).

La presencia de la tapadera ha servido para explicar, en parte, el fenómeno de “activación interfacial” que experimentan este tipo de enzimas cuando entran en contacto con una interfase lípido-agua por el cual su actividad aumenta drásticamente (Jaeger y Reetz, 1998; Schmid y Verger, 1998; Schrag y Cygler, 1997). Sin embargo, la base estructural de este fenómeno, y por ello, la diferencia entre esterasas y lipasas, parece ser algo más compleja por el hecho de que no todas las lipasas con tapadera exhiben este fenómeno (Nardini y Dijkstra, 1999; Noble *et al.*, 1993); y por otro lado, también hay lipasas carentes de esta estructura, o al menos está virtualmente ausente, que muestran activación interfacial (Chen *et al.*, 1998; Nardini y Dijkstra, 1999).

1.3.4. Mecanismo catalítico de lipasas y esteroles esterasas

El mecanismo catalítico de estas enzimas se ha estudiado principalmente basándose en estudios cristalográficos de complejos enzima-inhibidor y es similar al descrito para serín-proteasas (Kazlauskas, 1994). Beer *et al.* (Beer *et al.*, 1996) sugirieron para la lipasa de *R. oryzae* este mecanismo a partir de estudios cristalográficos, simulaciones y mutantes.

La hidrólisis del sustrato sigue un mecanismo en cuatro etapas y su descripción se debe a (Jaeger *et al.*, 1999) (**figura 1.9A**):

i) Se produce la unión del sustrato al bolsillo de unión de la enzima y la activación de la serina catalítica por la transferencia desde su grupo hidroxilo de un protón a la histidina catalítica. La transferencia es mediada por la presencia del residuo ácido que facilita la orientación del grupo imidazol de la histidina neutralizando parcialmente la carga. A continuación, tiene lugar el ataque del átomo de oxígeno cargado negativamente del grupo hidroxilo de la serina al carbono carbonílico activo del enlace éster susceptible de hidrólisis.

ii) Se forma un intermediario tetraédrico transitorio caracterizado por presentar una carga negativa en el oxígeno carbonílico del enlace a cortar y presentar los cuatro átomos unidos al átomo del carbono carbonílico dispuestos como un tetraedro. Este intermediario se estabiliza mediante el macrodipolo formado en la hélice αC y puentes de hidrógeno con el oxígeno carbonílico cargado negativamente (oxianión) y, al menos, dos grupos NH de la cadena proteica principal (agujero oxianiónico). Tras ello, el protón adicional de la histidina se transfiere al oxígeno del enlace éster susceptible de hidrólisis, que es

roto y se forma un intermediario covalente (acil-enzima) por enlace éster entre la serina catalítica y el ácido graso procedente del sustrato, mientras que el componente alcohólico difunde fuera de la proteína.

iii) Se produce la desacilación de la enzima mediante una molécula de agua que hidroliza el intermediario covalente. En este caso, una molécula de agua se activa como consecuencia de la sustracción de un protón por parte de la histidina catalítica. El ión hidroxilo (OH^-) producido ataca al carbono carbonílico del grupo acilo unido covalentemente a la serina en el intermediario sustrato-enzima. De nuevo, se vuelve a formar transitoriamente un intermediario tetraédrico cargado negativamente que es estabilizado por puentes de hidrógeno a través de los residuos del agujero oxianiónico.

iv) Al final, la histidina catalítica dona el protón que extrajo al oxígeno de la serina activa para liberar el grupo acilo rompiendo el enlace que lo mantiene unido a la enzima. Tras la difusión de la cadena acilo la enzima está lista para un nuevo ciclo catalítico.

El mapeo de la superficie electrostática de varias lipasas y esterases ha mostrado que el sitio activo de estas enzimas se encuentra cargado negativamente en su rango de pH óptimo (pH 6-10); de tal modo que, tras la rotura del enlace éster, el ácido carboxílico ionizado es inmediatamente expulsado del sitio activo debido a la repulsión electrostática entre su grupo carboxilo cargado negativamente y el potencial electrostático negativo del centro activo en lo que se llama mecanismo de “catapulta electrostática” (Petersen *et al.*, 2001).

Como se ha indicado, el acil-enzima se forma vía un intermediario tetraédrico (IT1) y posteriormente colapsa a través de la formación de otro intermediario tetraédrico (IT2). Así un estado transitorio que emule a IT1 determina la especificidad de la lipasas hacia los alcoholes (pues este abandona la proteína al tiempo que se forma el acil-enzima, es decir para la acilación); sin embargo, un estado transitorio que emule a IT1 o IT2 puede determinar la especificidad de la enzima frente al ácido carboxílico, porque ambos estados de transición contienen la fracción del ácido carboxílico, o sea para la desacilación. Según esto, la especificidad de estas enzimas hacia ácidos carboxílicos podría depender de cómo la formación o colapso del acil-enzima limita la velocidad de la reacción (Kazlauskas, 1994).

El mecanismo catalítico para reacciones de síntesis también se describe en cuatro pasos pasando por dos momentos de intermediario tetraédrico (**figura 1.9B**): se trata de un esquema idéntico en el que la diferencia reside en la naturaleza de los sustratos. El primer donador del grupo acilo es un ácido, en lugar de un éster; tras la rotura del primer intermediario tetraédrico se libera una molécula de agua y el ataque nucleofílico final lo realiza una molécula de alcohol, en vez de la molécula de agua.

En ambos casos, la velocidad de la reacción va a venir determinada por la velocidad de formación del complejo acil-enzima pues es la etapa más lenta. Cuanto mayor sea la deslocalización de la carga negativa en el agujero oxianiónico mayor será la estabilización del intermediario y esto se consigue con un número mayor de puentes de hidrógeno entre el intermediario y los residuos del bolsillo. Se trata, por tanto, de estabilizar la geometría del sitio activo. La geometría de los residuos que configuran el centro activo es rígida (triada y agujero del oxianión), esto quiere decir que los residuos catalíticos han de disponerse en una posición adecuada relativa los unos con los otros para una reacción eficiente de modo que la catálisis se puede ver fuertemente influenciada por pequeñas perturbaciones en la disposición de aquellos (Beer *et al.*, 1996).

-Introducción-

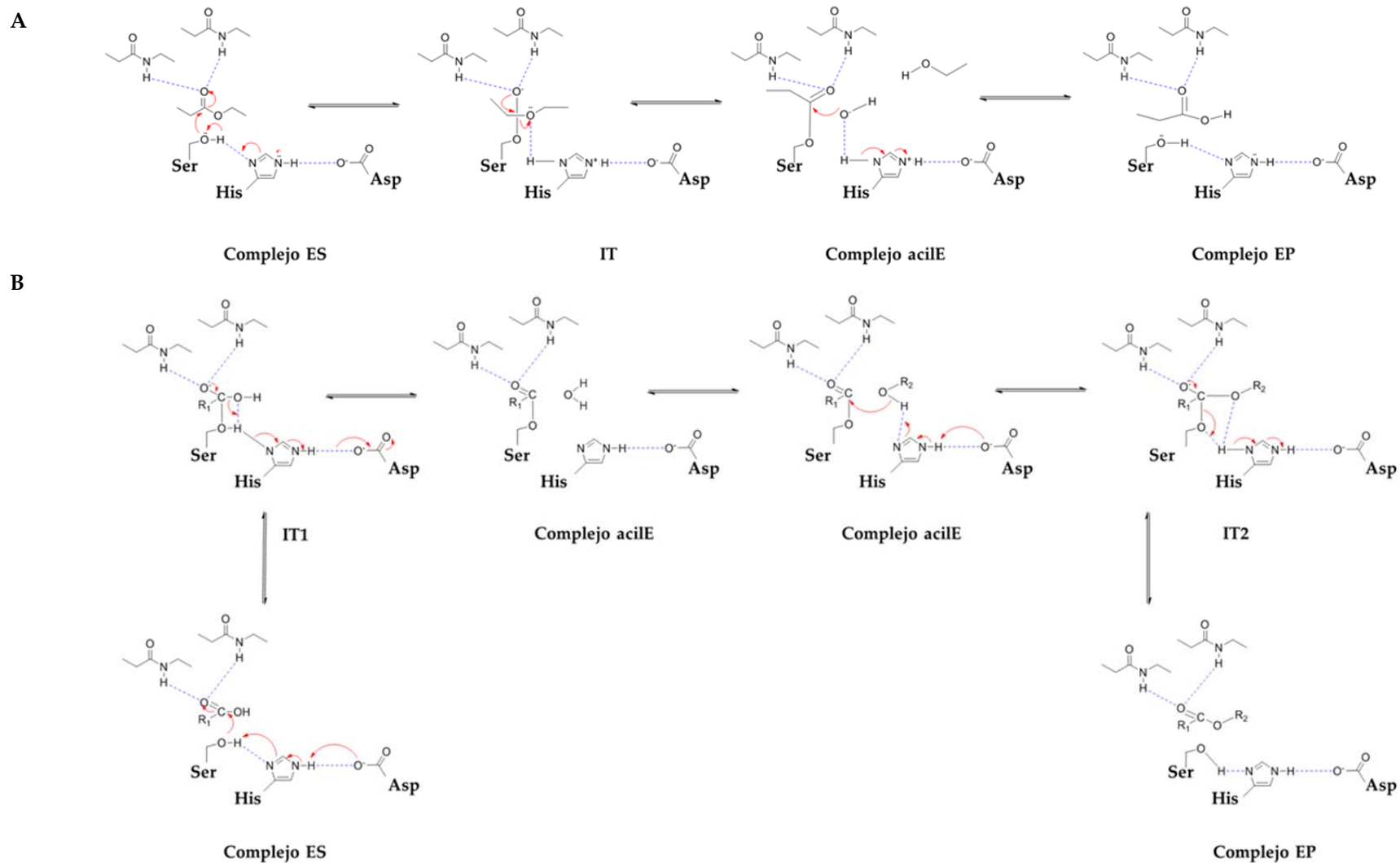


Figura 1.9. Mecanismo catalítico de esteroles esterasas: mecanismo general de hidrólisis (Jaeger *et al.*, 1999) (A) y de síntesis de ésteres (Walsh, 1979) (B). ES: complejo enzima-sustrato, IT: intermediario tetraédrico, acilE: complejo acil-enzima, EP: complejo enzima-producto.

1.3.4.1. Cambios conformacionales durante la catálisis

Parece claro que para alojar determinados sustratos, desde los más pequeños como ésteres de cadena corta de *p*-nitrofenol como a los de tamaño mayor del tipo triglicéridos, estas enzimas han de sufrir de pequeños a grandes cambios conformacionales y además estos cambios van a tener que ser más evidentes conforme aumenta el tamaño de la enzima; de hecho, se ha visto cómo la distancia de la tapadera, en la superficie de la proteína, al centro activo es mayor en la lipasa de *G. candidum* (18 Å) que en la lipasa de *R. miehei* (10 Å) (Cygler *et al.*, 1992).

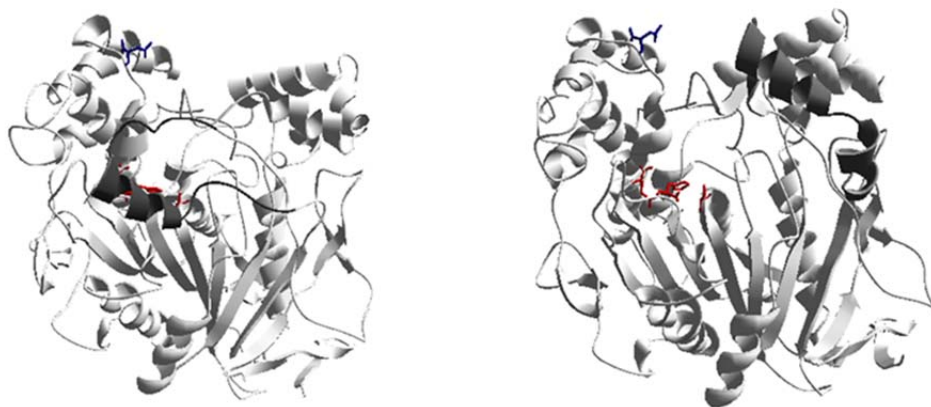
Por norma general, este tipo de enzimas se pueden encontrar en dos estados: “abierto” y “cerrado”, siendo en este último donde el sitio activo no es accesible para el sustrato. El paso de uno a otro tiene que ver con el desplazamiento de la tapadera, por movimiento de las estructuras que la conformen y su rotación. Esto va acompañado de cambios en la superficie, pues los residuos más hidrofílicos expuestos de esta estructura pasan a estar interaccionando con otros residuos de la vecindad acarreando una pérdida de la superficie hidrofílica total de la proteína en favor de un aumento de la hidrofobicidad porque además el desplazamiento de la tapadera deja expuestos residuos hidrofóbicos. Así, la tapadera queda estabilizada por numerosos puentes de hidrógeno en los que participan los residuos hidrofílicos que quedaron ocupados (Bordes *et al.*, 2010; Ranaldi *et al.*, 2010).

El mecanismo de activación sobre el cual opera el movimiento de la tapadera es todavía poco comprendido (Bordes *et al.*, 2010). Dependiendo de la arquitectura estructural de la tapadera se han propuesto varios mecanismos de transición: i) en lipasas con una tapadera consistente en una sola hélice, se ha sugerido que la transición entre ambos estados se deba a un movimiento rápido y rígido; ii) en contraste, en lipasas con tapaderas más complejas como la de *C. rugosa*, la estructura secundaria de la tapadera cambia durante el proceso de apertura, esperándose un reensamblaje parcial que puede suponer un cuello de botella en la cinética enzimática (Rehm *et al.*, 2010). Esto se pudo comprobar en los estudios de cristalización de la enzima LIP1 de *C. rugosa* (Grochulski *et al.*, 1994) donde además; a diferencia de otras enzimas; no se observaron cambios o reagrupamientos de la estructura a nivel del bolsillo oxianiónico indicando que éste se encuentra preformado en la forma cerrada o inactiva de la enzima.

En el caso de la LIP1 de *C. rugosa*, parece ser que el desplazamiento de la tapadera no se trataría de un movimiento que englobe a toda esta estructura sino que habría dos puntos que actuarían como bisagra en las posiciones Glu66 y Pro92, siendo la zona entre ambas la que sufriría los reajustes, y que ésta última sufriría una isomerización cis-trans que estabilizaría el estado activo junto con la cadena de carbohidrato unida a la Asn351. En concreto, se produce la rotación del enlace N-C α del Glu66 y la rotación del enlace peptídico C^{Ser91}-N^{Pro92}, se supone que la prolina que precede al Glu66 conferiría rigidez adicional a esta zona bisagra. De este modo, se puede observar cómo la tapadera ha rotado unos 90° de un estado a otro y ha pasado de encontrarse asentada sobre la superficie de la proteína a extenderse casi perpendicularmente a esta (**figura 1.10**). Este cambio implica el reordenamiento de la estructura de la tapadera entre las zonas bisagras como se describe en detalle en el trabajo de Grochulski y podría ser visto como un balanceo de la hélice $\alpha_{b3,2}$ sobre el puente disulfuro existente. Así, el centro de esta hélice recorre una distancia de 19 Å convirtiéndose en la parte de la tapadera más expuesta al solvente una vez abierta. Comparando las estructuras en ambos estados, se pudo comprobar cómo de los 534 carbonos alfa de la estructura sólo 508 alinearon en la superposición de ambas formas con una desviación de sólo 0,30 Å y precisamente 26 residuos de la tapadera difirieron en sus posiciones, algunos alcanzando una diferencia de 25 Å. Estos cambios se han usado para explicar el fenómeno de activación interfacial (Grochulski *et al.*, 1994).

-Introducción-

A



B

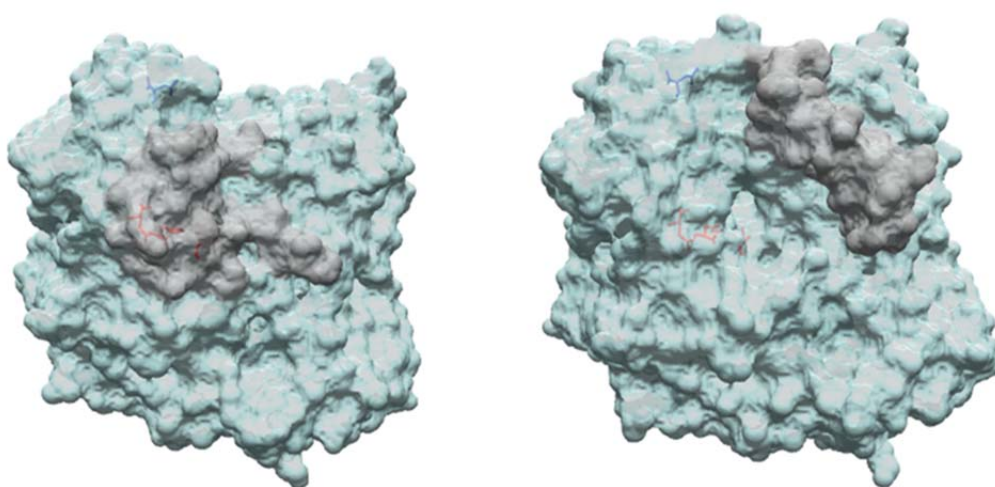


Figura 1.10. Estados conformacionales cerrado y abierto de la lipasa de *C. rugosa*, adaptado de Grochulski *et al.*, 1994. Diagramas de cintas o de Richardson (A) y representación de la superficie molecular de la proteína (B) en ambos estados vistos desde la misma dirección por encima del centro activo. Se puede observar el movimiento de la tapadera (en gris oscuro) entre las zonas bisagra; de modo que, en el estado abierto deja accesible la entrada al centro activo de la enzima mientras que el resto de la estructura de la proteína apenas cambia entre las dos conformaciones. En rojo se detallan los residuos de la triada catalítica y en azul el residuo Asn351 para que se aprecie sus posiciones con respecto a la de la tapadera. Figuras generadas con Swiss pdb viewer (Guex y Peitsch, 1997) a partir de las estructuras depositadas en el banco de proteínas 1TRH y 1CRL.

Las interacciones de la tapadera con el resto de la proteína varían entre los dos estados pero siempre conserva su naturaleza anfipática. En conformación cerrada la cara hidrofóbica de ésta se encuentra interaccionando íntimamente mediante contactos de naturaleza hidrofóbica con el resto de la proteína. Por el contrario, durante la conformación abierta la tapadera apenas establece interacciones con la superficie de la proteína y las que se establecen son a través de residuos de la cara hidrofílica. En estado cerrado la cara hidrofílica de la tapadera forma parte de la superficie de la proteína favoreciendo la interacción de la molécula de proteína con otras moléculas (dos según se ha descrito) mediante contactos polares y apolares que involucran a residuos de la hélice $\alpha_{b3,2}$ y otros cercanos a ella (principalmente en la interacción con la primera de las moléculas de proteínas). En estado abierto, las interacciones que se establecen son con una única molécula siendo por ello mucho menores pero todas ellas de carácter hidrofóbico e involucran sólo a la hélice $\alpha_{b3,2}$. Se piensa que estas interacciones hidrofóbicas serían importantes para la interacción de la enzima con la capa lipídica y la forma de aquella en estado abierto lo sugiere. Todo esto se traduce en un aumento de la superficie molecular expuesta de la proteína accesible al

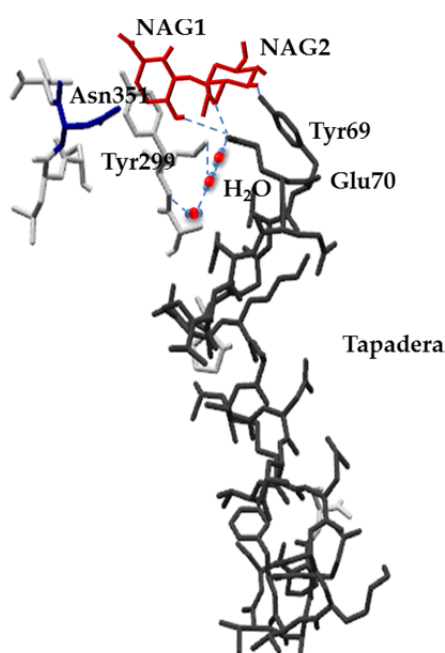
-Esterasa versátil-

solvente de unos 1530 Å² (un 10% de cambio respecto de la superficie de la forma cerrada) en donde predominan los aminoácidos hidrofóbicos, que junto a los aromáticos, suponen el 85% de dicha superficie constituyendo un parche hidrofóbico del que se ha mencionado anteriormente su posible finalidad. Parte de este aumento (~270 Å²) se debe a la superficie expuesta de la entrada del túnel de acceso al sustrato que se extiende desde la serina catalítica hasta el centro de la proteína, como se ha visto también con la lipasa de *G. candidum* (Grochulski *et al.*, 1994).

Parece ser que en el túnel de acceso para el sustrato no se producen grandes cambios, sólo pequeños desplazamientos de algunos residuos que hacen que éste esté algo más constreñido en la forma cerrada. En cuanto al agujero oxianiónico, como se indicó anteriormente, parece estar preformado en enzimas como las de *C. rugosa* y otras de la familia (acetilcolinesterasa) en las que el lazo L¹_{3,4}, que participa en su formación, no sufre alteraciones entre los dos estados, aunque en el caso de la lipasa de *G. candidum* esté lazo debería sufrir un desplazamiento tras la activación para que su posición coincida con el de *C. rugosa* (Grochulski *et al.*, 1994).

Los cristales de la lipasa de *C. rugosa* estudiada por estos autores demuestran que los dos sitios de N-glicosilación en las posiciones Asn314 y Asn351 efectivamente se encuentran ocupados por sendas cadenas de N-acetilglucosaminas. No se han visto cambios entre las formas abierta y cerrada de la proteína a nivel del sitio Asn314 pero en el caso del sitio Asn351 (posición conservada también en la lipasa de *G. candidum*) se ha visto una única molécula ordenada del azúcar en la forma cerrada de la enzima y dos unidades ordenadas en la forma abierta. La primera unidad de N-acetilglucosamina interacciona del mismo modo que en la forma cerrada con el anillo aromático de la Tyr299, colocándose justo por encima de él en ambas formas proteicas; mientras que en la forma abierta, forma además un puente de hidrógeno con el Glu70 y la segunda unidad interacciona mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de la Tyr69 y el Glu70 (**figura 1.11**). Estos contactos favorecen la estabilización de la tapadera en la forma abierta y disminuyen el carácter hidrofílico de los carbohidratos (Grochulski *et al.*, 1994).

El análisis de otras lipasas como la de *R. miehei* denota un mecanismo común para el paso de la forma inactiva a la activa de la enzima, incluso la adecuada superposición de su estructura con la de *C. rugosa* permite ver cómo los residuos que proporcionan los grupos -NH para la formación del agujero oxianiónico ocupan posiciones similares en la estructura global. En el caso de la lipasa pancreática humana, aunque a nivel topológico existen diferencias, sí que se ha descrito una estructura equivalente a la tapadera que desempeña exactamente la misma función (Grochulski *et al.*, 1994).



-Introducción-

Figura 1.11. Interacciones entre las moléculas de carbohidrato unidas al residuo Asn351 y los residuos de la tapadera en el estado conformacional abierto de la LIP1 de *C. rugosa*. Se muestran dos moléculas de N-acetilglucosamina perfectamente ordenadas (en rojo) de modo que la primera molécula alinea perfectamente con el anillo aromático de la Tyr299. Las interacciones se establecen mediante puentes de hidrogeno con los residuos Tyr69 y Glu70 de la tapadera en los que participan 3 moléculas de agua. Adaptado de Grochulski *et al.*, 1994.

1.3.5. Reacciones catalizadas por lipasas y esterol esterasas

Ya se ha mencionado que la reacción natural de este tipo de enzimas es la de hidrolizar ésteres, especialmente triacilglicerol de cadena larga dando lugar a di- y monoacilglicerol, glicerol y ácidos grasos; y también que en solventes orgánicos anhídridos, sistemas bifásicos o soluciones micelares son capaces de llevar a cabo la reacción inversa de síntesis dando lugar a reacciones de esterificación, transesterificación (acidólisis, interesterificación y alcoholólisis), aminólisis, tiotransesterificación y oximólisis (**figura 1.12**), actuando en los tres últimos casos sobre sustratos “no naturales” (Saxena *et al.*, 1999; Villeneuve *et al.*, 2000; Zaks y Klivanov, 1985).

El equilibrio entre hidrólisis y síntesis depende de la actividad de agua de la mezcla de reacción. Estas reacciones son catalizadas bajo condiciones suaves de presión y temperatura, gran especificidad y reducidas reacciones secundarias (Saxena *et al.*, 1999; Villeneuve *et al.*, 2000).

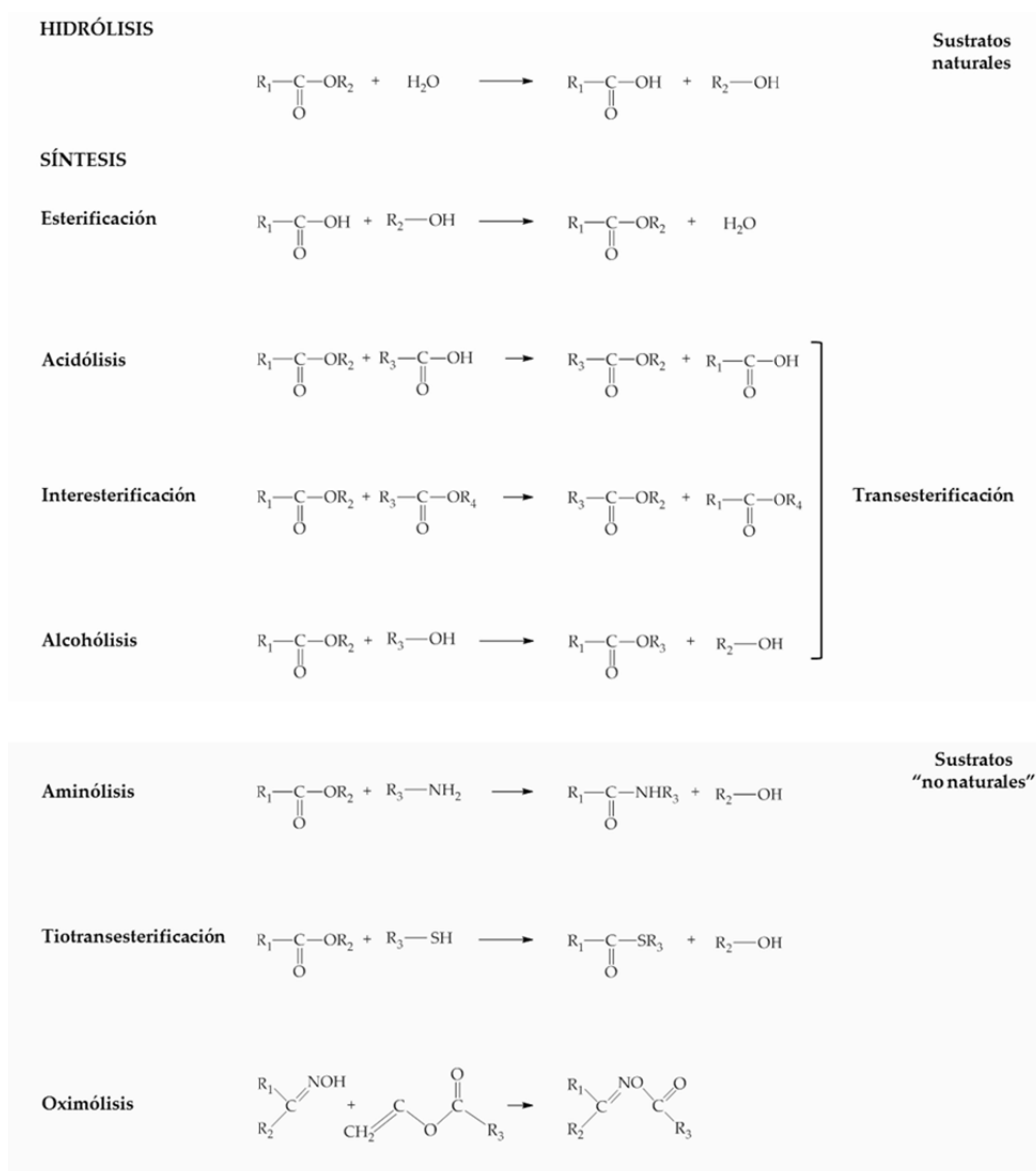


Figura 1.12. Tipo de reacciones catalizadas por lipasas en solución acuosa y orgánica. Adaptado de Saxena *et al.*, 1999; Villeneuve *et al.*, 2000.

1.3.6. No todas las lipasas presentan el plegamiento típico α/β -hidrolasa

Ya se ha comentado la fuerte similitud estructural de estas enzimas (hidrolasas en general) a pesar de su escasa homología de secuencias que se limita básicamente al motivo G-X-S-X-G que contiene la serina catalítica y que se encuentra en una estructura supersecundaria de lámina β -giro-hélice α (Derewenda y Derewenda, 1991). La topología de la lámina β central de estas enzimas se encuentra por tanto altamente conservada así como la localización en ella de los residuos que configuran el sitio activo, aunque las identidades de los residuos esenciales para la catálisis no están tan conservadas. En cualquier caso, la conservación de la estructura hace pensar que todas estas enzimas hayan divergido de un antepasado común (Cygler *et al.*, 1992). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de este pentapéptido en la secuencia no garantiza que la serina presente un papel catalítico pues en la misma proteína pueden existir varias de estas secuencias consenso (Derewenda y Derewenda, 1991). Parece ser que la serina de esta secuencia presentaría tal papel si viene codificada por los codones TCN o AGN pues se ha hipotetizado sobre la posibilidad de que las serinas catalíticas deriven del codón para cisteína TGN por mutaciones sencillas; por lo que, en un principio, estas enzimas procederían de una enzima ancestral que usaba cisteína como residuo nucleofílico (Brenner, 1988).

La lipasa de *G. candidum* (GCL) es probablemente la lipasa mejor conocida con especificidad de sustrato, ácidos grasos insaturados cis- Δ^9 de cadena larga, preferentemente de 18 átomos de carbono. Su estructura tridimensional se elucidó en 1991 con los estudios de Schrag y colaboradores (Schrag *et al.*, 1991) y por aquel entonces fue la primera vez que se describía un glutámico en vez de aspártico en la triada (Cygler *et al.*, 1992).

En 1995 se describió por primera vez una nueva familia de esterases/ lipasas (Upton y Buckley, 1995) pero aún en la actualidad muchas de sus características siguen sin haber sido elucidadas claramente ni descritas con precisión. Se sabe que no presentan el pentapéptido característico del que se ha venido hablando sino que presentan la secuencia G-D-S-L y de ahí que se las conozca como esterases/lipasas de tipo GDSL. No presentan homología de secuencia con las lipasas con plegamiento típico α/β y representan un caso de evolución convergente dentro de las lipasas y al igual que ocurre con las α/β hidrolasas en esta familia de GDSL-hidrolasas existen enzimas con diversas actividades.

Las lipasas de tipo GDSL (**figura 1.13**) son una de las cuatro familias que constituyen la superfamilia de las hidrolasas de tipo SGNH, llamadas así por presentar cuatro residuos catalíticos invariables que son Ser, Gly, Asn e His localizados en los bloques o secuencias consenso I, II, III y V respectivamente. Existen hasta cinco bloques descritos que albergan secuencias consenso y que son importantes para su clasificación. Las hidrolasas de tipo SGNH engloban a lipasas, proteasas, esterases, tioesterases, lisofosfolipasas, arilesterases, aciltransferasas y carbohidrato-esterases (Alalouf *et al.*, 2011). La secuencia consenso que las da el nombre [GDS(L)] aparece en el llamado bloque I que es donde se encuentra la serina catalítica. El motivo que contiene dicha serina se encuentra cercano al N-terminal de la proteína a diferencia de las lipasas con motivo G-X-S-X-G que se encuentra en el centro de la proteína. Esta serina actúa de nucleófilo y dona un protón al agujero oxianiónico, la glicina y la asparagina sirven como donadores de protones para la formación del agujero y la histidina actúa como base desprotonando a la serina y haciéndola más reactiva. La triada catalítica se completa con el aspártico situado tres posiciones por delante de la histidina (D-X-X-H) que estabiliza la carga positiva de la histidina catalítica, aunque en algunas enzimas como las de *Streptomyces scabies* en lugar de aspártico se ha descrito un triptófano y se habla más de una diada catalítica (Bornscheuer, 2002). Se caracterizan además por no presentar el bolsillo nucleofílico y por tener un centro activo flexible que se adapta a la unión de diferentes sustratos mientras que el centro de la molécula permanece prácticamente invariable. Éste centro activo sólo cambia de forma una vez que el sustrato se ha unido; de hecho, se ha descrito una misma enzima con actividades lipasa y proteasa por esa alta flexibilidad. (Bornscheuer, 2002). El mecanismo catalítico de estas enzimas, similar al de las lipasas convencionales, se describe en dos etapas: una primera de acilación con la formación del

-Introducción-

intermediario tetraédrico, rotura del enlace éster y formación del intermediario acil-enzima que finalmente sufre una desacilación liberándose la enzima. Este tipo de enzimas se han encontrado en diversas fuentes como: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio mimicus*, *Xenorhabdus luminescens*, *Streptomyces rimosus*, *Hevea brasiliensis* (árbol del caucho) u *Oryza sativa* (arroz); pero se pueden ver ejemplos en todos los reinos (Akoh *et al.*, 2004; Chepyshko *et al.*, 2012).

Todas las estructuras de las lipasas/esterasas de tipo GDSL descritas hasta hoy están constituidas por varias láminas β y hélices α dispuestas de manera alterna y el sitio de unión al sustrato se encuentra entre la lámina β central y una larga hélice α , pertenecen a la superfamilia de enzimas con plegamiento terciario de tipo α/β , aunque presentan diferencias sustanciales con respecto al plegamiento clásico de las “verdaderas lipasas” que radican en la diferente localización de los residuos que forman el sitio activo que dirige a la triada catalítica a una posición alejada de la lámina β paralela central. Pueden catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis (Akoh *et al.*, 2004).

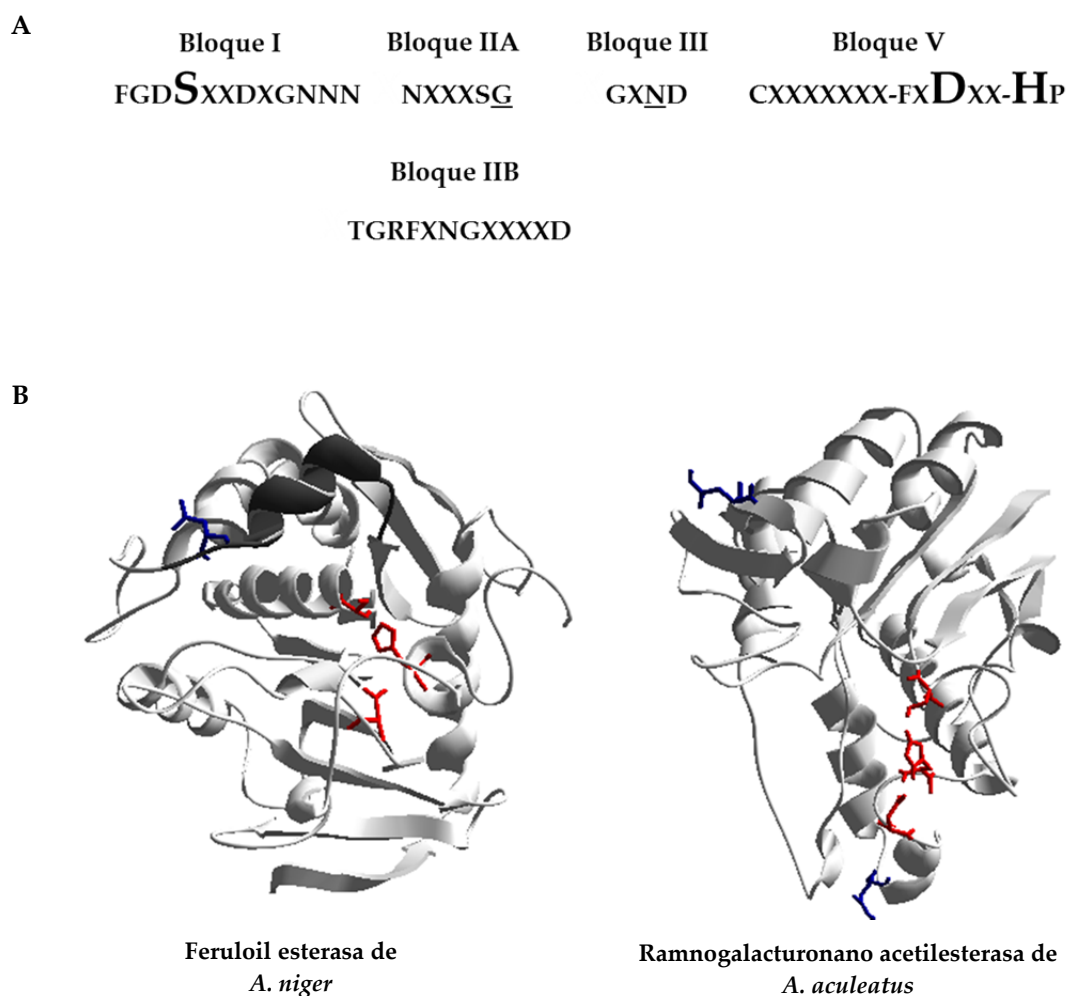


Figura 1.13. Esterasas/Lipasas de tipo GDSL. Bloques de secuencias conservadas dentro de la familia (A): los residuos de la triada catalítica se indican con letras sobredimensionadas; X hace referencia a cualquier aminoácido y los guiones a espacios en la secuencia; el bloque IIA es propio de las hidrolasas de la familia SGNH; adaptado de (Akoh *et al.*, 2004). Diagramas de cintas de la feruloil esterasa de *Aspergillus niger* (PDB 1USW) (Hermoso *et al.*, 2004) y de la ramnogalacturonano acetilesterasa de *Aspergillus aculeatus* (PDB 1DEX) (Mølgaard *et al.*, 2000) (B): ambas estructuras están orientadas respecto del lado N-terminal de la lámina β central. Mientras que la feruloil esterasa presenta un plegamiento típico de tipo α/β donde la triada catalítica (en rojo) alinea de forma casi paralela con la lámina β central; la ramnogalacturonano acetilesterasa presenta un plegamiento en sándwich $\alpha/\beta/\alpha$ de tipo flavodoxina donde los residuos de la triada alinean perpendicularmente a la lámina β central. Obsérvese la presencia de tapadera (en negro) en la primera estructura y su ausencia en la segunda. En azul se representan los residuos de Asn N-glicosilados. Figuras generadas con Swiss pdb viewer (Guex y Peitsch, 1997).

1.3.7. Fuentes y familias de lipasas/esterol esterases

En animales, en el caso de insectos se pueden encontrar, por este orden, mayoritariamente en plasma, glándulas salivares, cuerpos grasos y en músculos que participan en el vuelo. En mamíferos, las lipasas se encuentran en páncreas y en la superficie de células de la mucosa gástrica (Pahojá y Sethar, 2002). Dentro de las de mamíferos, ya en 1992 Cygler *et al.* (Cygler *et al.*, 1992) sugirieron que las enzimas llamadas colesterol esterases, en función de su alineamiento, se podían dividir, en realidad, en tres familias de enzimas: i) lipasa sensible a hormona (HSL) del tejido adiposo, regulada por fosforilación/desfosforilación de serinas de su extremo C-terminal; ii) lipasa estimulada por sales biliares, o colesterol esterase, que presenta una fuerte homología de secuencia con las carboxilesterasas y colinesterasas, así como con las lipasas de *C. rugosa* y *G. candidum*; y iii) lipasa ácida lisosomal. Con una secuencia aparentemente distinta se pueden encontrar también la lipasa pancreática activada por colipasa, la lipasa hepática y la lipoproteína lipasa; y por último, las llamadas lipasas ácidas caracterizadas por su pH óptimo ácido y en las que se encuentran la lipasa gástrica, lingual e incluso la lisosomal.

Las lipasas de plantas se encuentran sobre todo en semillas de cereales y semillas oleaginosas pero sólo durante la posgerminación, luego no se han visto en semillas no germinadas. Suelen presentar selectividad por el ácido graso mayoritario de la semilla. Las más estudiadas son las de avena (*Avena sativa*), semilla de colza (*Brassica napus*), semilla de ricino (*Ricinus communis*) y látex de papaya (*Carica papaya*). En cuanto a esta última, su actividad se detectó ya en 1935 y en los últimos años extractos vegetales de látex de papaya se han caracterizado presentando una fuerte actividad sobre tributirina y siendo estereoespecífica para la posición sn-3 en reacciones de hidrólisis y de interesterificación. En oleaginosas como la colza y la mostaza se ha comprobado la preferencia por las posiciones 1 y 3 del triglicérido. En algunos casos, estas enzimas podrían tener ventajas sobre las de mamíferos y las microbianas debido a su disponibilidad y bajo coste, facilidad de purificación y por tener selectividades inusuales, pero sus concentraciones son muy bajas en su fuente de origen; por ello, sus usos quedan relegados mayoritariamente a bioprocesos a escala de laboratorio pues su empleo en procesos a mayor escala resultan problemáticos, principalmente por la limitación de extraer suficiente enzima del material vegetal que se vaya a usar como fuente, con excepciones como la lipasa del látex de *Carica papaya*, del extracto de la cual se obtiene también la proteasa papaína muy usada a nivel industrial. Con el fin de usar estos biocatalizadores a nivel industrial se está optando por buscarlos en fuentes potenciales conocidas por presentar otra actividad enzimática como pueden ser materias primas ya usadas en otras aplicaciones industriales (Mukherjee, 2002; Villeneuve, 2003).

El enorme crecimiento experimentado desde los años ochenta hasta hoy en el número y conocimiento de estas enzimas se ha debido al clonaje y expresión de enzimas procedentes de microorganismos. Las lipasas procedentes de microorganismos son las más empleadas para biotransformaciones ya sea a escala de laboratorio, piloto o industrial debido a su estabilidad, selectividad y amplia especificidad de sustrato; siendo de hecho la clase de enzimas más usadas en aplicaciones biotecnológicas y de química orgánica y constituyen el grueso de las enzimas comercializadas de este tipo. El estudio de estas enzimas se produjo a partir del análisis del deterioro de los alimentos, principalmente lácteos, por hongos como *G. candidum*, *Penicillium restrictum* o *Candida cylindracea* (*C. rugosa*) (Jaeger y Reetz, 1998; Pahojá y Sethar, 2002; Treichel *et al.*, 2010). Bacterias, levaduras y hongos filamentosos aislados de diferentes hábitats como residuos industriales, factorías de procesamiento de aceites vegetales, industria láctea, suelos contaminados con aceites o de semillas oleaginosas son conocidos productores de lipasas (Treichel *et al.*, 2010). La característica más o menos extendida entre ellos es que el mismo organismo puede producir diferentes lipasas. Esta heterogeneidad en la producción de este tipo de enzimas viene tanto de diferencias en el patrón de glicosilación como de la expresión de múltiples genes. En ocasiones, estas enzimas son muy parecidas entre sí como ocurre con las lipasas de *G. candidum* o *C. rugosa* que son isoformas de genes muy semejantes; otras veces, se trata de enzimas muy distintas entre sí como sucede con *Penicillium cyclopium* (Cygler *et al.*, 1992).

-Introducción-

Con respecto a los hongos filamentosos, algunos de los productores de lipasas más importantes a nivel comercial pertenecen a los géneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp. y *Thermomyces lanuginosa* (*Humicola lanuginosa*) (Saxena *et al.*, 1999; Schmidt-Dannert, 1999; Treichel *et al.*, 2010). En función de su homología se pueden encontrar distintas familias, la más importante a nivel biotecnológico es la de *Rhizomucor miehei* que concentra las lipasas producidas por *R. miehei*, *P. camembertii*, *T. lanuginosa* y *Rhizopus oryzae* (y por extensión *R. delemar* y *R. niveus*) (Schmidt-Dannert, 1999).

En cuanto a levaduras, las principales productoras de lipasas pertenecen a las especies *C. rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida parapsilosis*, *Candida deformans*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Geotrichum* sp. (hongo dimórfico), *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bisporea*, *Pichia mexicana*, *Pichia stivicola*, *Pichia xilosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Torulaspora globosa* y *Trichosporon asteroides*. De todas ellas las lipasas de *C. rugosa*, *C. antártica* y *G. candidum* son las que han recibido más atención y han sido usadas en distintos campos (Treichel *et al.*, 2010). A nivel biotecnológico la familia más representativa es la de *C. rugosa* que incluye las enzimas producidas por ésta y por *G. candidum* (Schmidt-Dannert, 1999).

Entre las lipasas bacterianas más estudiadas y con potencial biotecnológico se encuentran las producidas por distintas especies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalophilus*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa* y otras especies y cepas), *Burkholderia* (*B. cepacia* y *B. multivorans*) y *Staphylococcus* (Treichel *et al.*, 2010). Dentro de este grupo hay que añadir las lipasas y esteroles producidas por los actinomicetos miembros del género *Streptomyces* (Côté y Shareck, 2008; Vujaklija *et al.*, 2002; Xiang *et al.*, 2007). A nivel biotecnológico, las más importantes son las enzimas de la familia de lipasas del tipo de las de *Burkholderia cepacia* que incluye a esta y a *Chromobacterium viscosum* (que produce una enzima idéntica a la de *Burkholderia glumae*) y *P. aeruginosa*; y por otro lado, la familia de *Staphylococcus* que incluye a enzimas producidas por *Bacillus thermocatenulatus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus aureus* (Schmidt-Dannert, 1999), estas últimas se caracterizan por estimularse en presencia de calcio (Saxena *et al.*, 1999).

La comparación de secuencias ha permitido establecer diferentes familias de lipasas microbianas, en sentido amplio, con esteroles entre sus miembros (Cygler *et al.*, 1992):

- i) Familia de lipasas del grupo de *Pseudomonas* sp.: *P. cepacia* DSM 3959, *P. fragi* IFO-12049, *P. aeruginosa*, todas ellas con una alta homología de secuencia. En el grupo también se incluyen las enzimas de *Chromobacterium viscosum* y podrían admitirse las de *Staphylococcus aureus* y *S. hyicus* a pesar de su limitada homología a cinco regiones específicas.
- ii) Familia de lipasas del grupo de *R. miehei*: incluye las enzimas del mismo y de *H. lanuginosa*, *Penicillium camembertii* U-150 y *R. delemar*.
- iii) Familia de lipasas de *Moraxella*: se trata de enzimas muy diferentes con respecto a las de los otros grupos y también entre ellas. Presentan el pentapéptido consenso y además un dipéptido His-Gly (HG) semejante al que se puede encontrar en lipasas de mamíferos y bacterianas, pero se ha rechazado que ese dipéptido marque la posición de la histidina catalítica al no estar presente en otras enzimas.
- iv) Familia de lipasas de *G. candidum* y *C. rugosa*: una amplia familia en la que también se pueden encontrar carboxilesterasas, colinesterasas y otras lipasas microbianas y de mamíferos. Dentro de la familia, las regiones más fuertemente conservadas son las del *core* o núcleo de la proteína. Concretamente, un 4% de los residuos está estrictamente conservados y un 20% de ellos

-Esterasa versátil-

muestra una ligera variabilidad. Las zonas de mayor variabilidad se concentran en la superficie de las proteínas, residuos o zonas que pueden modular la unión del sustrato y/o su especificidad o bien participar en la formación de estructuras cuaternarias.

- v) Familia de las cutinasas: la proteína modelo es la producida por *Fusarium solani* y el resto de las enzimas de la familia muestran un alto grado de homología con ella.
- vi) Familia de lipasas GDSL: con representantes en el mundo microbiano y en otros reinos y de la que se habló en el apartado 1.3.5.

Es importante destacar que las distintas familias de lipasas microbianas que se han ido citando pueden a su vez clasificarse en función de la “anatomía” del sitio de unión de la parte acilo del sustrato en el centro activo tal y como se comentó en la sección 1.3.2.4.

La **tabla 1.1** recoge las principales características de las lipasas pertenecientes a los tres grandes grupos descritos (Pahoja y Sethar, 2002).

Tabla 1.1. Principales características bioquímicas de lipasas

	Lipasas animales	Lipasas vegetales	Lipasas microbianas
Peso molecular (kDa)	43-300	19-270	32-97
Temperatura (°C)	37-60	20-38	37-55
pH	5,5-8,5	4,0-9,0	6,0-10,0
Activación	Calcio, zinc		Calcio
Inhibición	EDTA, Triton X-100, Tween® 80		FeCl ₃ , ZnCl ₂ , HgCl ₂

1.4. DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA ESTEROL ESTERASA DE *O. piceae* A PARTIR DE SU MODELADO COMPUTACIONAL POR HOMOLOGÍA

La esterol esterasa de *O. piceae* se encuentra codificada por un gen de 1,8 Kpb que carece de intrones, el marco de lectura es de 1.647 pb (secuencia depositada en GenBank/EBI *data bank* con número de ingreso AY899847) con un contenido en G+C del 57%. Contiene 549 aminoácidos plegados en un único dominio de los cuales los doce primeros corresponden al péptido señal. Las dimensiones de la molécula son aproximadamente 45x60x65 Å³ por comparación con la enzima de *G. candidum* (Cygler *et al.*, 1992). El armazón de la proteína está compuesto por una gran lámina β central mixta compuesta de 11 hebras, las centrales paralelas mientras que las cuatro primeras y las dos últimas son antiparalelas entre sí, 11 hélices α y una pequeña lámina β compuesta de tres hebras en el extremo N-terminal de la proteína (las dos primeras antiparalelas entre sí y la última paralela a la segunda) (**figura 1.14**). La gran lámina β presenta un gran giro levógiro de modo que la primera y última hebra quedan casi perpendiculares (Calero-Rueda, 2006; Calero-Rueda *et al.*, 2009).

Considerando que en la mayor parte de los casos documentados la serina catalítica se encuentra en el motivo Gly-X-Ser-X-Gly, en el codo nucleofílico, la serina catalítica se ha adscrito al residuo 208 de la enzima de modo que en la estructura tridimensional de la proteína se observa una disposición de los residuos Ser208, His453 y Glu340 reminiscente de aquella de la triada en otras lipasas y en las serín proteasas. La serina se encuentra en un giro cerrado entre la hebra β_5 y la hélice $\alpha_{5,6}$. El Glu340 viene de un lazo desde la hebra β_7 , dos hebras tras la serina, y se encuentra en una secuencia también conservada Gly-X4-Glu/Asp-Gly. Finalmente, la His453 se encuentra embebida en el lazo C-terminal que sale de la hebra β_8 dentro de la secuencia conservada Gly-Sm-X-His-Sm-X-Glu/Asp (donde X es cualquier aminoácido y Sm un aminoácido de pequeño tamaño) (**figura 1.14**). Dentro de la estructura los residuos de la triada se

-Introducción-

localizan en el fondo de un túnel largo en la región C-terminal de la lámina β central cuyo acceso se encuentra cubierto por dos grandes bucles formados por los residuos 73-80 y 85-89 con parte de estructura en hélice α que supuestamente desempeñaría el papel de tapadera (**figura 1.15A y B**), aunque en la enzima no se ha descrito el fenómeno de activación interfacial (Calero-Rueda *et al.*, 2002), estas zonas comprenderían las hélices α_1 3,2 y α_2 3,2. En cuanto a los componentes del agujero oxianiónico, Ala209 y Gly123, se localizan después de la hebra β_5 y entre la hebra β_3 y la hélice $\alpha_{3,4}$, respectivamente (Calero-Rueda, 2006; Calero-Rueda *et al.*, 2009).

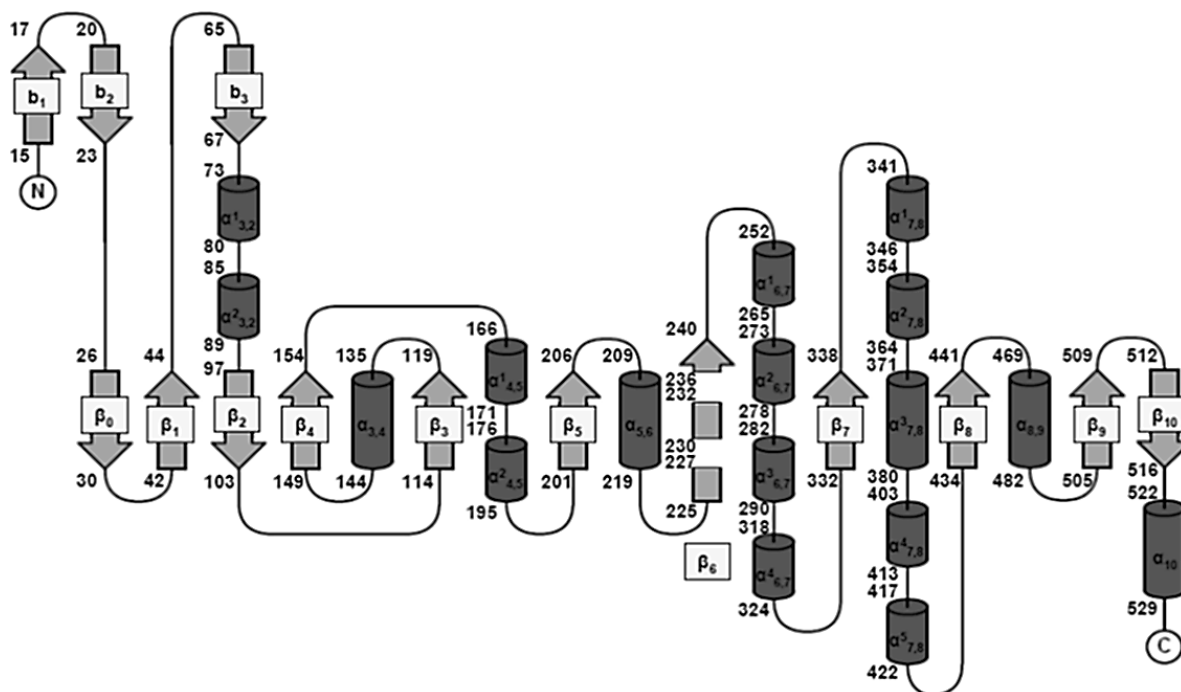


Figura 1.14. Estructura secundaria de la esterol esterasa de *O. piceae* (Calero-Rueda *et al.*, 2009)

En la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína entrarían en juego: i) la formación de hasta dos puentes disulfuro entre los residuos Cys60-Cys96 y Cys267-Cys276, ambos importantes para estabilizar los dos bucles que cubren el centro activo, uno estaría situado cerca del final del bucle formado por los residuos 73-80 y el segundo cerca de la punta del bucle que va desde las posiciones 85 a 89. ii) puentes salinos formados entre residuos cargados situados en bucles cercanos. Podrían establecerse cuatro puentes salinos en la estructura, por homología con las enzimas de *C. rugosa* y *G. candidum*, según el pH: los tres primeros Arg37-Glu94, Arg156-Asp180 (la arginina pertenece a la secuencia conservada Tyr-Arg-Val/Leu-Gly-X2-Gly- Phe/Leu) y Arg278-Asp171 se encuentran muy cercanos entre sí en la estructura 3D de la enzima y actuarían de forma cooperativa manteniendo unidos los bucles superficiales de la proteína, algunos de los cuales podrían jugar un papel en el acomodamiento del sustrato. El cuarto puente salino entre Asp412-Arg521 (muy conservado el residuo ácido formando parte de la secuencia conservada Asp-X2-Phe/Val) se encuentra alejado del centro activo aunque podría interferir en la actividad más que en el plegamiento. Y iii) en el esqueleto de la proteína podrían formarse puentes de hidrógeno que implicarían a los residuos conservados Gln181-Ser213, Asp95-Ser93, Tyr155-Phe120, Asn191-Trp187 y Asp198-Ser200. También aquellos en los que participaría la triada catalítica y los formados entre el residuo ácido catalítico (Glu, en este caso) y los residuos Gln337 y Ser240. Estos puentes se forman para estabilizar el sustrato en el centro activo de la enzima. El glutámico catalítico establecería un puente de hidrógeno con la histidina catalítica gracias a la formación de dos puentes de hidrógeno a través de los hidrógenos peptídicos del residuo -3 respecto del residuo ácido (Gln337) y de la Ser240 (Calero-Rueda, 2006).

En la formación del agujero oxianiónico estarían implicados los residuos de la secuencia tipo G-G-G-X (Gly121-Gly122-Gly123-Phe124). Concretamente, se formaría a través de los grupos NH del esqueleto de la proteína de los residuos Gly123 y Ala209 y la cadena lateral de la Gly122 pues son aquellos más probables de formar puentes de H con el estado transitorio o intermediario tetraédrico. La Phe124 está muy conservada en este tipo de proteínas (Calero-Rueda, 2006).

Con respecto a los sitios de N-glicosilación se han descrito en la proteína 3 según la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, concretamente la Asn110, Asn350 y Asn368; pero sólo la posición 350 parece conservarse respecto de las lipasas de *C. rugosa* y *G. candidum* (Calero-Rueda, 2006; Calero-Rueda *et al.*, 2009).

En cuanto al sitio de reconocimiento y unión al sustrato, exceptuando aquéllas zonas de la tapadera que podrían estar implicadas en el reconocimiento o estabilización del sustrato, se piensa que por homología con las distintas isoenzimas de *C. rugosa* se trataría de un túnel de entrada que podría presentar forma de "L" y en el que se podrían diferenciar dos regiones en función de la naturaleza de los residuos que lo cubren: i) una zona alifática en el fondo del túnel y ii) una región aromática en la región más cercana al exterior que es donde se concentran las mayores diferencias entre la enzima de *O. piceae* y las de *C. rugosa* que podrían ser la base de sus diferentes especificidades (**figura 1.15C y D**). La fuerte superficie hidrofóbica en la zona de entrada del túnel ayudaría a extraer moléculas de lípidos de las superficies lipídicas e inyectarlos al túnel. En principio, tal y como se ha visto a partir de otras estructuras cristalizadas en presencia de sustrato o inhibidores, parece ser que la parte del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno de éster de esterol quedaría expuesta hacia el exterior del túnel y la cadena acilo se acomodaría entre las dos zonas mencionadas; de modo que, el extremo cercano al carbono carbonílico, que forma el enlace éster, quedaría perfectamente orientado en las proximidades del oxígeno hidroxílico de la serina catalítica y cerca de la zona hidrofóbica de la entrada mientras que la parte de la molécula cercana al extremo metilo (carbono ω) interaccionaría con los residuos de la zona alifática del sitio de unión. Así, la totalidad de la cadena acilo podría establecer contactos con los residuos del túnel mediante fuerzas de van der Waals. Esta configuración podría ser similar para ésteres del tipo de ésteres de *p*-nitrofenol; mientras que para triglicéridos, la molécula se orientaría en el centro activo adquiriendo una conformación "en tridente" tal y como se ha descrito para la lipasa pancreática (Egloff *et al.*, 1995): partiendo de que el núcleo de glicerol quedaría "centrado" en el bolsillo, una de las cadenas acilo quedaría orientada hacia la salida del túnel atraída por el parche hidrofóbico de su entrada y la tapadera, otra se orientaría en dirección a la bicapa lipídica del sustrato y la última estaría orientada hacia el fondo del túnel cercana a la región hidrofóbica estando el enlace éster de esa posición estabilizado por los residuos del agujero oxianiónico (Calero-Rueda, 2006; Mancheño *et al.*, 2003).

En la **tabla 1.2** se hace una comparación de los residuos presentes en las distintas isoenzimas de *C. rugosa* y la esterol esterasa de *O. piceae* que podrían ser determinantes para explicar sus diferentes especificidades. Parece ser que los residuos en las posiciones 127, 132 y sobre todo el residuo 450 son importantes determinantes de la especificidad; de manera que, se ha corroborado cómo el aminoácido de esta posición 450 puede hacer cambiar la especificidad por triacilgliceroles en LIP1 a ésteres de colesterol en LIP3 y por extensión a LIP2 y la enzima de *O. piceae* dada su similitud a LIP3. También el residuo en posición 69, en la zona de la tapadera, y los residuos 296 y 344, en la región aromática del túnel hidrofóbico, parecen pautar las distintas especificidades de estas enzimas (Calero-Rueda, 2006; Mancheño *et al.*, 2003).

-Introducción-

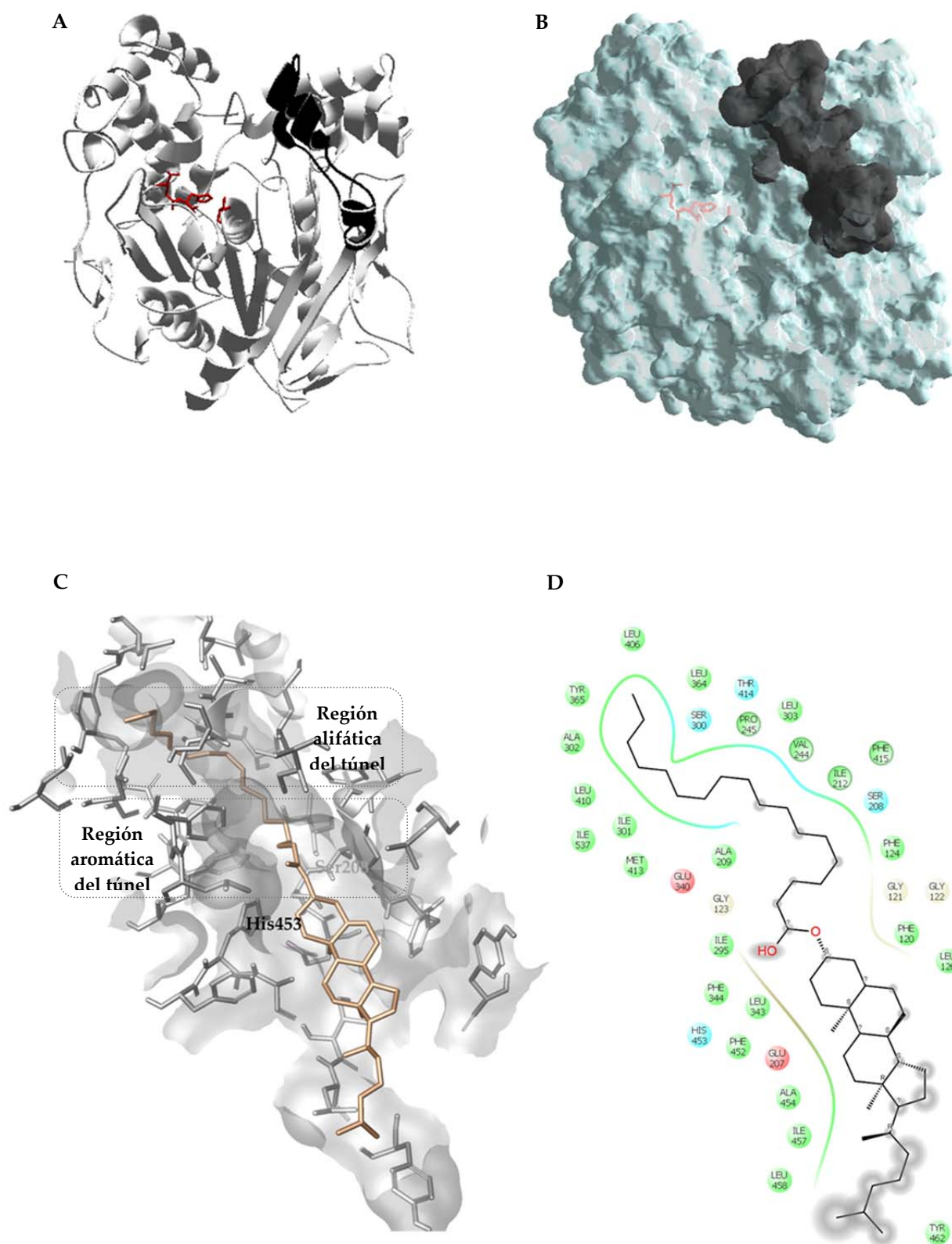


Figura 1.15. Estructura terciaria de la esteroles esterasa de *O. piceae* mostrando las posiciones de los residuos de la triada catalítica (en rojo) y la zona de la posible tapadera (en negro) (A), la superficie molecular (B), la interacción con linoleato de colesterilo (C) y detalle de dicha interacción (D). Modelos generados con *spdbviewer* y el programa Maestro v9.3.5 (Schrödinger). El pdb del complejo enzima-linoleato de colesterilo se obtuvo a partir del programa de modelado I-TASSER (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Yang y Zhang, 2015; Zhang, 2008).

Tabla 1.2. Comparación de los posibles residuos determinantes de la especificidad en isoenzimas de *C. rugosa* y la esterol esterasa de *O. piceae*. Se muestran sombreados los residuos iguales en una posición dada. Datos procedentes de Calero-Rueda, 2006; Mancheño *et al.*, 2003

		LIP1	LIP2	LIP3	OPE
Tapadera		T68	S68	T68	T67
		Y69	F69	F69	G68
		E70	E70	E70	N69
		E71	D71	E71	G70
		N72	T72	N72	E71
		L73	L73	L73	L72
		P74	P74	G74	L73
Bisagra		K75	K75	K75	F74
		A76	N76	T76	Q75
		V86	I86	V86	L85
		F87	F87	F87	F86
		E66	M66	E66	L65
		P92	P92	P92	L91
Zona interacción tapadera-túnel		T132	L132	I132	Y131
		F133	F133	F133	Y132
		P134	P134	P134	D133
		P135	G135	G135	G134
		A136	D136	D136	I135
		Q137	Q137	Q137	D136
Bolsillo Hidrofóbico		V127	L127	I127	L126
		T132	L132	I132	Y131
		S450	G450	A450	A454
Túnel	Región aromática	F125	F125	F125	F124
		L296	L296	L296	V296
		F344	L344	I344	L343
		F345	F345	F345	F344
		F415	F415	F415	F415
	Región alifática	V245	V245	V245	V244
		P246	P246	P246	P245
		R302	R302	R302	A302
		S304	S304	S304	S304
		P307	P307	P307	P307
		L410	L410	L410	L410
		L413	L413	L413	M413
		V534	V534	V534	I537

-Introducción-

1.5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ENZIMAS EN *Pichia pastoris*

El empleo de la tecnología del ADN recombinante facilita la obtención de grandes cantidades de enzimas de interés a bajo coste, así como la posibilidad de realizar ingeniería de proteínas para la obtención de biocatalizadores a medida para que puedan ser usados en la industria (Schmidt-Dannert, 1999).

1.5.1. Levaduras metilótrofas, peroxisomas y metabolismo del metanol

1.5.1.1. Las levaduras metilótrofas

Por definición estas levaduras, pertenecientes a los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*, son capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono. Con el clonaje y caracterización de los elementos promotores que controlan los altos niveles de expresión de las enzimas alcohol oxidasa (AOX) y dihidroxi-acetona sintasa (DHAS), enzimas claves del metabolismo del metanol que constituyen del 60 al 80% de la proteína total celular en condiciones de crecimiento en presencia del alcohol, las levaduras metilótrofas ofrecen un gran potencial como factorías para la producción heteróloga de proteínas (Faber *et al.*, 1995).

La relevancia industrial de las levaduras metilótrofas está aumentando drásticamente debido a algunas características intrínsecas que son importantes tecnológicamente: a diferencia de *S. cerevisiae*, pertenecen al grupo de levaduras *Crabtree* negativas de modo que producen muy poco etanol bajo condiciones totalmente aeróbicas de crecimiento lo que las permite crecer en altas densidades celulares en biorreactores con el aumento de producto consiguiente. Tienen una alta tendencia a la secreción de proteínas incluso de alto peso molecular a diferencia de lo que ocurre con *S. cerevisiae* que puede retenerlas en el espacio periplásmico, incluso péptidos pequeños, lo que unido a lo anterior supone que pueden llegar a secretar cantidades de proteína de gramos por litro (Hartner y Glieder, 2006).

La levadura metilótrofica *P. pastoris* (**figura 1.16A**) es la especie de levadura más usada para la producción heteróloga de proteínas y es empleada en laboratorios de todo el mundo para la producción de proteínas para investigación básica y para aplicaciones médicas. Se trata también de un importante organismo modelo para el estudio de la biogénesis peroxisomal y la asimilación de metanol (De Schutter *et al.*, 2009).

P. pastoris fue estudiada inicialmente por la compañía *Phillips Petroleum* para la producción de *single cell protein* (SCP) durante los años setenta. No obstante, fue durante la década siguiente cuando esta compañía en colaboración con el *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.* (SIBIA, La Jolla, CA, USA) la propusieron como sistema heterólogo de expresión. Probablemente, *P. pastoris* sea en la actualidad la levadura no convencional (alternativa a *S. cerevisiae*) en la que más proteínas se han expresado (Domínguez *et al.*, 1998; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

1.5.1.2. Peroxisomas

Los peroxisomas son orgánulos encontrados, en principio, en todas las células eucariotas que se caracterizan por la presencia de catalasa y al menos una oxidasa productora de agua oxigenada. Estos se encuentran delimitados por una membrana sencilla y varían drásticamente en tamaño, abundancia y contenido enzimático dependiendo del organismo, tipo celular y condiciones ambientales. En humanos son imprescindibles para la supervivencia pues están involucrados en una variedad de procesos catabólicos y anabólicos como la degradación oxidativa de ácidos grasos de cadena larga, purinas y aminoácidos, así como en la síntesis de colesterol y ácidos biliares. Al carecer de ácidos nucleicos y ribosomas todas las proteínas peroxisomales son codificadas en el núcleo, sintetizadas en polisomas libres e importadas al peroxisoma a través de secuencias señales específicas (Johnson *et al.*, 1999).

-Esterasa versátil-

En levaduras, la proliferación de peroxisomas está fuertemente inducida por el crecimiento en fuentes de carbono como el ácido oleico y el metanol (**figura 1.16B**), según los estudios se ha visto que las levaduras necesitan los peroxisomas sólo para el metabolismo de esas fuentes de carbono y no otras; es más, mutantes de levaduras deficientes en la biogénesis peroxisomal son defectivos para crecer en tales fuentes de carbono (Johnson *et al.*, 1999).

La alcohol oxidasa es una enzima de la matriz peroxisomal que cataliza la primera reacción de la ruta de asimilación del metanol (Johnson *et al.*, 1999).

1.5.1.3. Metabolismo del metanol: ruta MUT (*methanol utilization*)

Las levaduras metilotróficas comparten una única ruta MUT cuya expresión se encuentra estrechamente regulada a nivel de transcripción. Las primeras etapas de la ruta se encuentran compartimentalizadas en el interior de los peroxisomas; por ello, estos orgánulos proliferan masivamente tras la inducción con metanol llegando a ocupar el 80% del espacio citoplasmático (Hartner y Glieder, 2006).

En el primer paso del uso del metanol, éste es oxidado a formaldehído y peróxido de hidrógeno por una alcohol oxidasa (AOX, EC 1.1.3.13). El peróxido es tóxico y es roto a oxígeno y agua por catalasas (CAT, EC 1.11.1.6). Ambas reacciones ocurren en el interior de los peroxisomas. El formaldehído generado puede seguir dos rutas catabólicas (Hartner y Glieder, 2006; Wegner y Harder, 1987) (**figura 1.16C**):

- i) La vía o ruta desasimilatoria, en la que es oxidado por dos reacciones consecutivas catalizadas por deshidrogenasas. Aquí el formaldehído reacciona espontáneamente con glutatión rindiendo S-hidroxitimetilglutatión que es oxidado en dos reacciones consecutivas a dióxido de carbono por la acción de una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y de NAD⁺ (FLD, EC 1.2.1.1) y por una formato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (FDH, EC 1.2.1.2) ambas citosólicas. El NADH generado en estas dos reacciones de deshidrogenación se supone que es utilizado para obtener energía para sustentar el crecimiento en metanol. Esta ruta además de proporcionar energía, sirve para la detoxificación del formaldehído y formato producidos. Así, una S-formilglutatión hidrolasa (FGH, EC 3.1.2.12) hidroliza el S-formilglutatión a formato y glutatión que vuelve a estar disponible para la formaldehído deshidrogenasa. Esta vía también juega un papel importante en el metabolismo de fuentes de nitrógeno metiladas como colina o metilamina donde se produce formaldehído como producto secundario que ha de ser eliminado por su alta toxicidad para las células (mayor que la del formato).
- ii) La vía asimilatoria, donde entra al metabolismo central de la levadura y se condensa con xilulosa 5-fosfato mediante la reacción catalizada por la enzima peroxisomal dihidroxiacetona sintasa (DAS, EC 2.2.1.3) que convierte a aquellos en los compuestos de tres átomos de carbono dihidroxiacetona y gliceraldehído 3-fosfato que siguen metabolizándose en el citosol.

La expresión de los genes de la ruta asimilatoria del metanol se reprime por glucosa y etanol y es fuertemente inducida por metanol. El etanol y la glucosa actúan mediante dos mecanismos distintos para reprimir la ruta. Debido a su papel en el metabolismo del nitrógeno, la regulación de la expresión de las enzimas de la vía desasimilatoria es algo diferente ya que a diferencia de los genes para AOX o DAS, los genes para FLD y FDH se inducen también en presencia de fuentes de nitrógeno metiladas independientemente de la presencia o no de glucosa. En células inducidas, las enzimas claves pueden suponer el 30%, en el caso de la AOX, y el 20%, para la suma de DAS y FDH, del total de proteínas solubles (Hartner y Glieder, 2006).

-Introducción-

El número de genes que codifican para alcohol oxidasas varía entre las distintas especies de levaduras metilotróficas así como su regulación, pues existen casos en los que el glicerol y otras fuentes de carbono (sorbitol, xilosa,...) desreprimen incluso en presencia de glucosa. En el caso de *P. pastoris*, lo que ocurre es que en condiciones de crecimiento no limitante en glucosa, etanol o glicerol los dos genes codificantes para alcohol oxidasa (genes *aox1* y *aox2*) se encuentran reprimidos pues ambos muestran el mismo patrón de regulación (Cregg *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989).

La catalasa se induce durante el crecimiento en metanol para neutralizar la producción de peróxido de hidrógeno y su expresión precede a la de AOX y la de los otros genes de la ruta MUT para que una vez agotada la glucosa las células estén preparadas frente al peróxido, su regulación es a nivel transcripcional y postraduccional por su importación al peroxisoma (Eggeling y Sahm, 1978; Horiguchi *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1998).

Como las otras enzimas de la ruta MUT, la expresión de las formaldehído deshidrogenasas de las distintas levaduras está regulada a nivel transcripcional pero no están sujetas a represión por glucosa tal y como se comentó; en el caso de *P. pastoris*, se induce fuertemente por metanol pero también por formaldehído (Lee *et al.*, 2002a). Los genes de formato deshidrogenasa no están tan bien caracterizados; en *P. pastoris*, hasta la secuenciación de su genoma en 2009 (De Schutter *et al.*, 2009), sólo se había descrito un fragmento de ADN conteniendo el ORF y sólo se sabía de su expresión por otras levaduras siendo semejante a la de la formaldehído deshidrogenasa (Goldberg *et al.*, 2006). En cuanto a la dihidroxiacetona sintasa, en *P. pastoris* sólo se había descrito su región promotora antes del 2009 (Tschopp *et al.*, 1987), su regulación parece ser a nivel transcripcional y semejante a la de AOX.

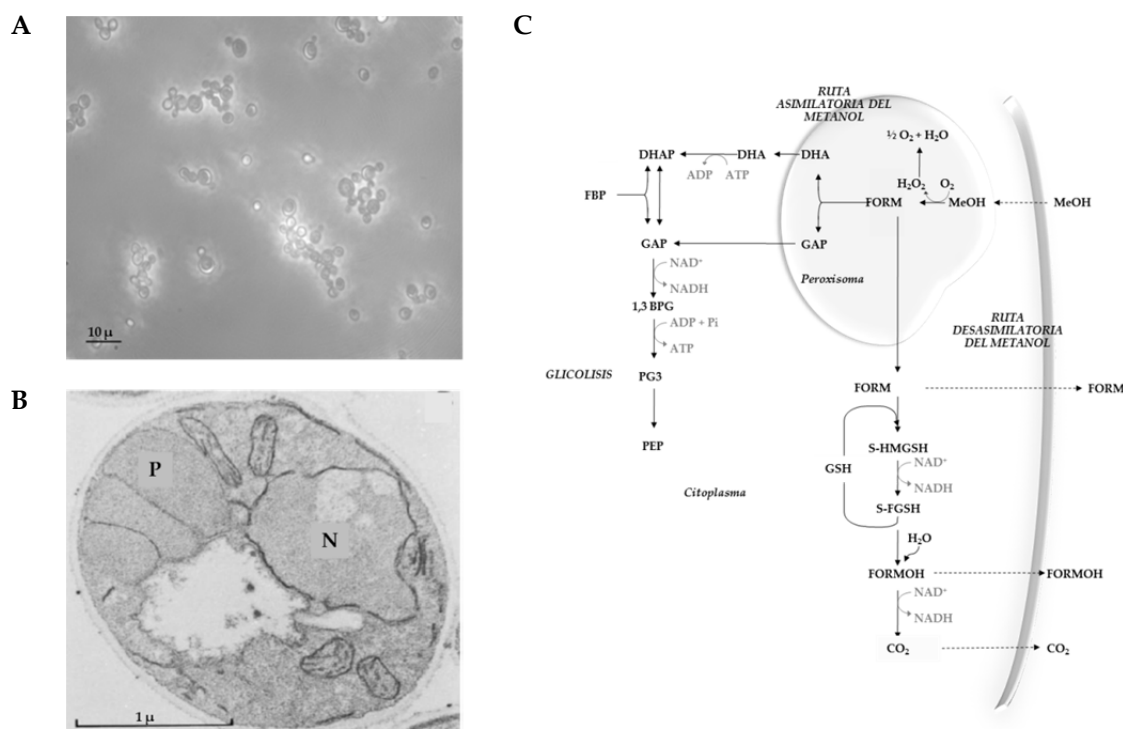


Figura 1.16. *P. pastoris*, micrografía de contraste de fases tomada con una Cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX sobre microscopio óptico Zeiss Axioplan (A); se observa la morfología ovalada de la levadura y células en gemación. Micrografía electrónica mostrando la morfología subcelular de la levadura creciendo en Metanol (B), se puede ver el núcleo (N) y el gran tamaño que adquieren los peroxisomas (P), (Johnson *et al.*, 1999). Ruta metabólica de utilización del metanol (C). MeOH: metanol, FORM: formaldehído, S-HMGSH: S-(hidroximetil) glutationa, S-FGSH: S-formilglutaciona, GSH: glutaciona, FORMOH: ácido fórmico, DHA: dihidroxiacetona, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, GAP: gliceraldehído 3-fosfato, 1,3 BPG: 1,3 bifosfoglicerato, PG3: 3-fosfoglicerato, PEP: fosfoenolpiruvato, CO₂: dióxido de carbono, NAD(H): forma oxidada y reducida de dinucleótido de nicotinamida adenina, ADP: adenosina difosfato, ATP: adenosina trifosfato.

Los estudios en quimiostato han permitido averiguar que el nivel de sensibilización por represión por catabolito (glucosa) varía entre todas las levaduras metilotróficas. Además de la regulación general por metanol, también existe cierta regulación específica a nivel de cada uno de los genes de la ruta MUT pues todos ellos se comportan de una manera distinta en función de las condiciones de cultivos (tipo de sustrato, dilución, ...). Además, distintos estudios han puesto de manifiesto que para que se repriman los genes de la ruta MUT es un prerequisite necesario que la glucosa o la fructosa sean captadas por transportadores del medio y fosforiladas por quinasas. (Hartner y Glieder, 2006).

1.5.2. Estructura del genoma de *P. pastoris* e importancia biotecnológica

Hasta el año 2009 se sabía que el genoma de la levadura se organiza en cuatro cromosomas con un total de 9,7 Mpbs por electroforesis de campo pulsado. El ensamblaje y secuenciación del genoma de la levadura por De Schutter *et al.* permitió calcular un tamaño para éste de 9,43 Mpbs con un contenido de GC del 41,1%. La anotación del genoma resultó en 5.313 genes codificantes de proteínas de los cuales cerca del 75,2% presenta un homólogo en las base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y representan un 80% de la secuencia del genoma, con una longitud media del gen de 1.442 pbs. En cuanto a genes de ARN se han anotado 123 para ARNt nuclear y 21 para ARNr 5S; estos últimos esparcidos a lo largo de toda la secuencia de todos los cromosomas en vez de estar en el loci para ADNt de cada cromosoma que contiene las secuencias codificantes de ARNr 18S, 5.8S y 26S. El genoma mitocondrial presenta un tamaño de 36.119pbs con 16 genes codificantes y 31 de ARNt. En general la utilización de codones es similar a la de *S. cerevisiae* (De Schutter *et al.*, 2009).

La secuenciación del genoma de la levadura (Nº de acceso FN392319–FN392325 de la base de datos de secuencias nucleotídicas de EMBL) facilitará el desarrollo de cepas mejoradas con propiedades a la carta para la producción de altos niveles de proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales definidas. De hecho, esto ha permitido la secuenciación de todas las enzimas participantes en la ruta MUT y de sus promotores para su estudio y aprovechamiento en producción heteróloga. Así como un conocimiento mayor de la maquinaria de secreción de proteínas que permitirá desde el diseño de nuevas secuencias señales de secreción a la modificación de la glicosilación; así como, el desarrollo de cepas deficientes en las principales proteasas (vacuolares o secretadas) (De Schutter *et al.*, 2009).

1.5.3. Características de *P. pastoris* como sistema de expresión heteróloga

Hasta el año 2014 cerca de 5000 proteínas (www.pichia.com y *Pichia 2014 Protein Expression Conference, San Diego, CA USA*) se expresaron en esta levadura con niveles de expresión representando el 80% del total de proteína secretada o hasta el 30% del total de la proteína celular. De ellas hay casi 300 licencias industriales y más de 70 productos comercializados y otros tantos con uso terapéutico en desarrollo (www.pichia.com y *Pichia 2014 Protein Expression Conference, San Diego, CA USA*).

Entre las características que reúne *P. pastoris* para ser elegida como factoría para la expresión de proteínas recombinantes y justifican su éxito como tal se encuentran las siguientes:

- i) Comparada con *S. cerevisiae*, las células de *P. pastoris* son más pequeñas y permanecen en una fase haploide (Higgins y Cregg, 1998), aunque ambas comparten muchos rasgos anatómicos y fisiológicos, la diferencia más destacada de esta última es la capacidad de integrar ADN exógeno por recombinación homóloga, lo que hace que sea fácil de manipular genéticamente, ofreciendo una alta frecuencia de transformación y originando clones genéticamente estables que muestran una gran estabilidad en ausencia de presión selectiva incluso cuando están presentes en múltiples copias (Higgins y Cregg, 1998). Esto contrasta con el caso de *S. cerevisiae* en donde el uso preferencial de vectores episomales conlleva inestabilidades en la cepa resultando en inconsistencias durante producciones a gran escala (Gellissen *et al.*, 2005).

-Introducción-

- ii) *P. pastoris* es sencilla de cultivar y es típicamente crecida en cultivos de elevada densidad celular (cultivos en discontinuo alimentado) sin producir etanol para obtener una gran productividad lo que supone una propiedad clave de la levadura (Lin-Cereghino *et al.*, 2001). Los cultivos en fermentador de *P. pastoris* son esenciales para producir los niveles más altos posibles de una proteína heteróloga, especialmente si se trata de una proteína secretada. Hay que entender que a *P. pastoris* no le gusta fermentar por lo que en ella, a diferencia con *S. cerevisiae*, el término “fermentar” es inapropiado. Los rendimientos de proteínas heterólogas producidas en fermentador suelen estar entre los µg/L a g/L dependiendo de las propiedades empíricas del gen, su transcrito y la proteína (Higgins y Cregg, 1998).
- iii) La disponibilidad de promotores fuertes altamente regulados que conducen a la sobreexpresión del gen de interés rindiendo altas cantidades de proteína (Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).
- iv) Como organismo eucariota es capaz de producir proteínas correctamente replegadas que han sufrido todas las modificaciones postraduccionales requeridas para su funcionabilidad, ofreciendo, por tanto, ventajas significativas con respecto a la expresión en sistemas procariotas como *Escherichia coli* (Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). En cuanto a glicosilación, la cadena que suele añadir *P. pastoris* es de Man8-9GlcNAc2; éste núcleo puede ser extendido por las manosiltransferasas del Golgi dando en algunos casos hiperglicosilación (Lin-Cereghino *et al.*, 2002) aunque no tan marcada como *S. cerevisiae* en donde además, las cadenas de N-carbohidratos acaban en un enlace de tipo α1,3-manosa que se caracteriza por su potencial alergénico (Gellissen *et al.*, 2005).
- v) La baja cantidad de proteínas endógenas secretadas por la levadura facilitan la purificación de enzimas recombinantes secretadas.
- vi) *P. pastoris* es un organismo no patogénico por lo que las proteínas recombinantes producidas por ella estarán libres de pirógenos (a diferencia de la derivadas de *E. coli*), toxinas e inclusiones virales (a diferencia de aquellas derivadas de cultivos celulares de mamífero) haciéndolas seguras para su uso en humanos (Lin-Cereghino *et al.*, 2002; Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Porro *et al.*, 2005).
- vii) Entre otras ventajas de *P. pastoris* es su disponibilidad como kit de Invitrogen Co. (San Diego, CA, USA) (Lin-Cereghino *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

1.5.4. Factores que afectan la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*

Aunque el rendimiento final en la producción de una proteína va a depender de sus propiedades inherentes; no obstante, éste va a estar influenciado por la manipulación de los factores que influyen en la expresión génica y la estabilidad del producto. Los factores que drásticamente van a influir en la producción en este sistema son los siguientes (Potvin *et al.*, 2012; Sreekrishna *et al.*, 1997):

- i) El número de copias del *cassette* de expresión, aunque su efecto sea impredecible.
- ii) El sitio (AOX1 o HIS4) y modo de integración del *cassette* de expresión (con o sin desahucio de las secuencias codificantes AOX1 dando distintos fenotipos) en el cromosoma de la levadura.

-Esterasa versátil-

- iii) El ARNm 5' y regiones 3' UTR, lo que se traduce en que básicamente la inserción del gen de interés no ha de modificar la zona 3'UTR del ARNm de *aox1* al insertarse.
- iv) El contexto del codón de inicio de la traducción AUG. No se ha de encontrar en la zona 5'UTR de *aox1* ni en zonas donde el ARNm pueda formar estructuras secundarias. La secuencia 5' UTR tiene el potencial de influir en la expresión proteica pero se requiere una mayor comprensión de su regulación. A día de hoy lo que se sabe es que la inserción del gen de interés ha de mantener la longitud de la región 5' UTR de *aox1*; esto se consigue cuando el primer codón ATG del gen heterólogo insertado se encuentra lo más cercano posible al primer ATG de *aox1*, esta posición suele coincidir con el sitio de restricción más cercano a 5' en los vectores usados con *P. pastoris* y suele ser un sitio *EcoRI* en el *polilinker*. Además, evitar añadir nucleótidos por delante del AUG de la secuencia codificante foránea es otra consideración importante para obtener una producción eficiente de la proteína recombinante (Lin-Cereghino *et al.*, 2001; Staley *et al.*, 2012).
- v) La composición A+T del ADNc ha de ser del 30-55% porque un alto contenido evita la transcripción del gen por una terminación prematura.
- vi) Los bloques transcripcionales y transduccionales. Concretamente considerar que el uso de codones del organismo del que procede el gen a expresar sea igual que el de *P. pastoris*.
- vii) El promotor que va a dirigir la expresión de la proteína recombinante.
- viii) Conservación de los puntos de procesamiento proteolítico. La presencia de los espaciadores Glu-Ala entre el prepropéptido señal del factor alfa de *S. cerevisiae* y la secuencia de la proteína ayuda a aliviar la interferencia estérica de la proteína fusionada resultando en una zona de corte eficiente de la prosequencia por la proteasa tipo KEX2 de *P. pastoris*.
- ix) Puntos de glicosilación en la proteína heteróloga.
- x) La naturaleza de la señal de secreción. Los niveles de proteína heteróloga secretada suele ser de 1mg/L a por encima de 10 g/L y aunque se usen las mismas cepas, vectores y metodología esa amplia horquilla depende de la eficacia de la secreción que no reside sólo en la secuencia señal empleada sino que también, en parte, de la naturaleza estructural de la proteína; es más, debe existir cierta combinación entre información actuando en cis en la secuencia señal escogida y su proteína acompañante que resulta crucial para la correcta secreción de la proteína al medio extracelular. Por tanto, dar con la señal adecuada resulta bastante arbitrario; sin embargo, la más usada es la del prepropéptido señal del factor alfa de *S. cerevisiae* con 85 aminoácidos de longitud (Lin-Cereghino *et al.*, 2002).
- xi) La actividad proteasa endógena de *P. pastoris*.
- xii) La fisiología de la cepa hospedadora.

-Introducción-

- xiii) Los medios de cultivo, condiciones de crecimiento y parámetros de cultivo. Obviamente, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto van a afectar directamente a mecanismos moleculares e indirectamente al crecimiento de la levadura.

1.5.5. Promotor AOX1, cepas y fenotipos en *P. pastoris*

Anteriormente se mencionó que la alcohol oxidasa (AOX) es la primera enzima en la ruta MUT. Como su nombre indica es capaz de oxidar otros alcoholes alifáticos primarios a parte del metanol. Es importante destacar que la enzima tiene poca afinidad por el oxígeno por lo que las células tratan de compensar tal hecho sintetizando altas cantidades de enzima que queda en el interior de los peroxisomas en las levaduras metilotróficas. Actúa como un octámero con una estructura cristalóide que hace que el peroxisoma adquiera forma cuboidal en el interior de las células. En *P. pastoris* se encuentra codificada por dos genes: *aox1* y *aox2*, ambos presentan un 90% de homología de secuencia pero difieren en sus secuencias flanqueantes; concretamente en sus secuencias reguladoras localizadas 5' aguas arriba de la secuencia codificante, es decir, en sus promotores y en sus niveles de transcripción y no en diferencias en la estabilidad de sus ARNm, ensamblaje de la proteína o actividad específica. De tal modo que *aox1* representa el 95% de la enzima expresada debido a la fuerza de su promotor, lo que en células inducidas supone del 5 al 35% del total de la proteína soluble celular según si se trata de cultivos en Erlenmeyer con metanol o cultivos en fermentador a tasas de crecimiento limitante en metanol, respectivamente; sin embargo, su expresión es indetectable en células crecidas en glucosa, glicerol o etanol (Couderc y Baratti, 1980; Cregg *et al.*, 1989; Potvin *et al.*, 2012).

Los genes *aox1* y *aox2* se encuentran regulados tanto por un sistema de represión-desrepresión como de inducción. Tras desreprimirse, el nivel de ARNm de *aox1* es del 1-2% respecto del estado inducido; en este sólo un 5% del ARNm poliA es de *aox1* mientras que los niveles de mensajero son indetectables en otras fuentes de carbono, poniendo de manifiesto cómo el metanol dispara un sistema de inducción sensible y poderoso (Cregg y Madden, 1988). Células con *aox1* delecionado crecidas en metanol contienen una tercera parte de la actividad AOX respecto del salvaje presentando un tiempo de generación en el alcohol de unas 30 horas frente a las 4,8 horas de una cepa salvaje (Cregg *et al.*, 1989). El papel fisiológico de *aox2* en *P. pastoris* se desconoce y no hay estudios sobre ello; en otras levaduras metilotróficas, como *Pichia metanolica*, se asume que supone una ventaja frente a altas concentraciones de metanol pues curiosamente se induce mucho más para compensar esos niveles elevados; lo que se explicaría con la formación de la enzima según la afinidad por el metanol de las subunidades que la forman (Hartner y Glieder, 2006).

El promotor AOX1 (pAOX1) fue aislado y usado por primera vez con el fin de desarrollar vectores y protocolos de ingeniería genética por investigadores del Instituto Salk de Biotecnología (California, EEUU) y la empresa *Industrial Associates Inc.* Los sistemas regulados por pAOX1 son los más comunes (Potvin *et al.*, 2012). Es fuertemente reprimido en células creciendo en glucosa y muchas otras fuentes de carbono (glicerol, etc.) pero se induce unas 1000 veces en medios con metanol como única fuente de carbono (Lin-Cereghino *et al.*, 2002). Incluso se ha creado una librería de variantes modificadas del mismo mostrando patrones de regulación con distinto grado de control por sustrato aumentando su efectividad en un rango del 6 al 160% respecto del silvestre (Hartner *et al.*, 2008).

Tanto en los promotores de *aox1* como de *aox2* se han encontrado secuencias importantes que regulan su expresión. En el pAOX1 se han identificado tres regiones a las cuales se unen proteínas reguladoras de distinta naturaleza: i) el sitio de unión de Mxr1p, es una región de 243 pbs (-415 a -172, siendo la posición +1 la A del codón ATG del gen *aox1*), donde se une el factor de transcripción Mxr1p (de *metanol expression regulator 1*, cualquier mutación o deleción en él causa la pérdida o la disminución en la transcripción de genes de la ruta MUT y de proteínas peroxisomales; lo que fenotípicamente se traduce en incapacidad para crecer en metanol u oleato y bajas tasas de crecimiento en glucosa y glicerol y la falta de expresión conducida por el pAOX1); ii) la región C (entre las posiciones -540 y -400) y iii) la región A aguas arriba de -690, parece que a ellas se unen dos proteínas, aún desconocidas, en condiciones de inducción con

metanol y con etanol para la región C y sólo con metanol para la A (Inan, 2000; Lin-Cereghino *et al.*, 2006). En el pAOX2 se han descrito dos secuencias URS (URS1 y URS2) y una secuencia UAS (Ohi *et al.*, 1994).

La mayoría de los promotores usados hasta la fecha en *P. pastoris* derivan de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo del metanol y que están en altas concentraciones en las células como el pAOX1, del cual se ha venido hablando, el promotor de la dihidroxiacetona sintasa (pDHAS) o el promotor de la formaldehído deshidrogenasa (pFLD1) que se induce tanto por metanol como por metilamina (Stadlmayr *et al.*, 2010). No obstante, existen promotores alternativos al pAOX1, que no se inducen por metanol, que se pueden usar cuando el producto de interés se va a emplear en la industria alimentaria o en producciones a gran escala donde el metanol puede ser un compuesto peligroso e inflamable (Lin-Cereghino *et al.*, 2001). Entre ellos se encuentra el pGAP, promotor constitutivo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se aisló por primera vez en 1997 y se ha usado desde entonces con glucosa o glicerol como sustratos aunque también hay expresión en presencia de metanol. En comparación con los sistemas que usan pAOX1, el uso de pGAP opera bajo mínimos requerimientos de control en cultivos en continuo (Potvin *et al.*, 2012). También existen promotores constitutivos como el de YPT1, una GTPasa involucrada en secreción, aunque se usa poco al ser débil y dar bajos niveles de expresión, el de la fosfoglicerato quinasa (pPGk1), una enzima altamente expresada durante la glicolisis, que es efectivo tanto con glucosa, glicerol y metanol, aunque los mayores niveles de expresión se alcanzan con glucosa; y el promotor del factor de elongación de la traducción 1- α (pTEF1) con una fuerza comparable a la de pGAP y siendo una clara alternativa a éste (Potvin *et al.*, 2012). Además, el empleo de estudios de perfiles de expresión génica mediante *microarrays* junto con la selección de promotores de otras especies de levaduras según la literatura ha permitido identificar hasta 24 nuevas secuencias reguladoras que podrían ser empleadas; si bien, el promotor del gen de biosíntesis de tiamina (THI11) parece ser uno de los más prometedores por sus altos niveles de transcripción a tasas específicas de crecimiento bajas (es dependiente de la fase de crecimiento) y con interesantes características regulatorias dependientes de la disponibilidad de la vitamina en el medio (se reprime con ella) (Stadlmayr *et al.*, 2010).

En comparación con otros modelos como *Saccharomyces* el número de promotores disponible para *P. pastoris* es limitado y en muchas ocasiones se circunscribe a la utilización de los promotores fuertes como pAOX1 y pGAP, pues el resto no se emplea de manera rutinaria en procesos de producción (Stadlmayr *et al.*, 2010).

Todas las cepas de expresión de *P. pastoris* derivan de la cepa NRRL-Y 11430 (Böer *et al.*, 2007). Las cepas de *P. pastoris* se pueden dividir en varios grupos: cepas salvajes (X-33 e Y-11430), mutantes auxotróficos para el gen de la histidinol deshidrogenasa (GS115), mutantes defectivos en genes del metabolismo del metanol (KM71, MC-100 3) y cepas deficientes en proteasas (SMD1163, SMD1165, SMD1168) (Higgins y Cregg, 1998). A su vez, se pueden encontrar 3 tipos de fenotipos en función de la utilización del metanol: i) cepas Mut⁺ en las que los dos genes *aox* son funcionales y presentan un metabolismo del alcohol y crecimiento silvestre. Requieren largas cantidades de metanol durante el cultivo pero tienen una gran sensibilidad a concentraciones elevadas de éste lo que las hace difíciles de controlar y escalar, al mismo tiempo que la expresión de AOX puede competir con la expresión de la proteína recombinante por la maquinaria celular disponible disminuyendo los niveles de producto (Potvin *et al.*, 2012). Además, la combustión del metanol (-727 kJ·mol⁻¹) resulta en la producción de calor que es un problema en procesos de escalado; sin embargo, debido a su alto crecimiento y producción de producto recombinante es el fenotipo de cepa más usada (Krainer *et al.*, 2012). ii) Las cepas Mut^s presentan el gen *aox1* delecionado, por lo que su crecimiento está condicionado por la expresión de *aox2*, presentando una tasa de crecimiento más baja aliviando así la fuerte necesidad de metanol y oxígeno de la cepa Mut⁺ haciéndolas más fáciles de escalar. iii) Por último, están las cepas Mut⁻ que carecen de ambos genes y por ello no pueden crecer en presencia de metanol (Potvin *et al.*, 2012). La velocidad específica máxima de crecimiento en metanol para los tres fenotipos de la levadura es de 0,14, 0,04 y 0 h⁻¹, respectivamente (Stratton *et al.*, 1998).

-Introducción-

1.5.6. Tecnología de bioprocesos y condiciones operacionales para cepas con pAOX1

Debido a la gran demanda mundial de proteínas heterólogas y bioproductos se ha realizado un considerable progreso en ingeniería de bioprocesos con el fin de desarrollar sistemas de producción de alto rendimiento económicamente viables. En la actualidad, *P. pastoris* es uno de los sistemas más efectivos y versátiles para la expresión de proteínas heterólogas desde que surgiera a principios de los años setenta (Potvin *et al.*, 2012). Este sistema de expresión es especialmente útil cuando la maquinaria de síntesis proteica de *E. coli* falla en la producción de proteínas perfectamente plegadas y *S. cerevisiae* produce proteínas hiperglicosiladas inactivas (Jahic *et al.*, 2006). Además, aún creciendo en metanol, *P. pastoris* es aerobio estricto, a diferencia de *S. cerevisiae*, pudiendo crecer a elevadas densidades celulares incluso bajo limitación de oxígeno (Charoenrat *et al.*, 2005; Jahic *et al.*, 2006). De este modo, aunque la productividad específica de muchas proteínas sea relativamente baja, esto se compensa por una productividad relativamente constante a lo largo de varios días y porque las células pueden seguir creciendo en metanol a altas concentraciones celulares excediendo los 150 g/L de peso seco celular (Jahic *et al.*, 2002). Por otro lado, el medio mineral usado para *P. pastoris* (conteniendo sólo glicerol o metanol, biotina, sales y elementos traza) es económico y está bien definido, lo que hace que esta levadura sea ideal para producción de proteínas heterólogas a gran escala en biorreactores. Además, sólo en éstos parámetros como el pH, la aireación y la velocidad de adición de la fuente de carbono se pueden controlar haciendo posible lograr densidades celulares ultra elevadas (>100 g/L peso seco celular, >400 g/L peso húmedo celular, >500 unidades de D.O.₆₀₀/mL) (Lin-Cereghino *et al.*, 2002).

Dentro de la tecnología de bioprocesos se pueden encontrar distintos sistemas de operación:

- i) Se denomina proceso en discontinuo o *batch* al tipo de cultivo en fermentador en el que el crecimiento de las células es exponencial, lo que significa que en cultivos aerobios la tasa de consumo de oxígeno también aumenta exponencialmente. Eventualmente, la concentración de oxígeno disuelto llega a ser limitante del crecimiento; por ello, para extender el crecimiento sin limitación de oxígeno se suele emplear un proceso en discontinuo alimentado (Jahic, 2003).
- ii) Un proceso en discontinuo alimentado o semicontinuo o *fed-batch* se refiere a los cultivos en fermentador en los que uno de los sustratos, componente del medio, normalmente la fuente de carbono y energía, se añade al medio de forma continua a una tasa que resulta en un consumo de oxígeno aceptable; de modo que, se pueden alcanzar mayores densidades celulares. Las características típicas de este tipo de bioproceso son una concentración del sustrato limitante y DOT cuasi-estacionarias, tasa específica de crecimiento disminuyendo lentamente, y un aumento de biomasa que llega a un máximo (Jahic, 2003).
- iii) También se pueden encontrar procesos en continuo o quimiostato, que fueron en origen desarrollados por Monod, y que se caracterizan por ser cultivos balanceados mantenidos por tiempo indefinido por un sistema abierto de flujo con entrada de medio al sistema desde un reservorio y salida de éste de medio consumido con células y restos celulares; de modo que, el sistema termina alcanzando el equilibrio permaneciendo el número de células y la concentración de nutrientes en el sistema constantes, por lo que se dice que el sistema está en estado estacionario y con las células creciendo exponencialmente. Las pérdidas de células por drenaje se compensan con las ganancias por crecimiento así que el crecimiento de nueva biomasa es igual a la tasa a la cual el cultivo está siendo diluido (Hoskisson y Hobbs, 2005).

-Esterasa versátil-

La empresa Invitrogen facilita un manual para el cultivo en discontinuo alimentado de *P. pastoris* (Invitrogen™, 2002b) basado en los estudios realizados por Brierley *et al.* (Brierley *et al.*, 1990). El cultivo se diseña en relación a la regulación de la expresión del pAOX1 (Jahic *et al.*, 2006) desarrollándose en tres etapas: una fase en discontinuo con glicerol, una fase de transición y finalmente una fase de inducción con metanol. Se trata de un proceso en el que se trabaja a elevadas densidades celulares para lograr una alta productividad de proteína recombinante y que obviamente no puede llevarse a cabo en un Erlenmeyer sino en un biorreactor por la alta demanda de oxígeno necesaria para el crecimiento en metanol y en segundo lugar porque la actividad de AOX es mayor cuando se mantiene el metanol a concentraciones limitantes de crecimiento (Jahic, 2003):

- i) Fase en discontinuo con glicerol: esta fase se usa para la generación rápida de biomasa para luego ser inducida con metanol en etapas posteriores. La concentración habitual de glicerol, según los protocolos, suele ser de 40 g L⁻¹; ya que, concentraciones mayores suelen inhibir el crecimiento e incluso a concentraciones mayores del 7% hay autores que han encontrado producción de etanol (Chiruvolu *et al.*, 1998). En esta etapa no se produce producto debido a la represión del pAOX1, pero al crecer la levadura más rápido en glicerol ($\mu_{\max} = 0,23 \text{ h}^{-1}$) que en metanol ($\mu_{\max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$) beneficia la productividad futura ya que también hay que considerar que esa diferencia se acentúa aún más cuando la levadura está produciendo una proteína heteróloga por el efecto negativo que tiene tal producción sobre el crecimiento; además, en esta fase la tasa de muerte celular es menor a la obtenida con metanol por su toxicidad (Cos *et al.*, 2005; Jahic, 2003). En esta fase el rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$) es de 0,5 g de biomasa (peso seco) por cada gramo de glicerol por lo que se espera obtener una concentración de biomasa de 20 g L⁻¹. El final de esta fase se caracteriza por un aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo o por una disminución de la velocidad específica de producción de dióxido de carbono o de la velocidad específica de consumo de oxígeno; es decir, por una disminución de la actividad respiratoria (Gurramkonda *et al.*, 2009; Ramón Real, 2007).
- ii) Fase de transición: esta fase tiene como objetivo la obtención final de la biomasa deseada previa a la inducción y facilitar lo más rápidamente posible el cambio metabólico para comenzar a utilizar el sustrato inductor (Curvers *et al.*, 2001a). Se han descrito muchas estrategias para conseguir este propósito jugando con las adiciones de glicerol y metanol, pero independientemente de ella, los autores coinciden en llegar a unos 30 g L⁻¹ de biomasa teniendo en cuenta la velocidad específica de consumo de glicerol de *P. pastoris* de 0,0688 g g⁻¹X⁻¹h⁻¹ (Cos *et al.*, 2006b). Una de las mejores estrategias para cepas Mut⁺ consiste en programar una rampa de adición decreciente de glicerol, en condiciones de sustrato limitante, y mantener un flujo constante de metanol (Chen *et al.*, 1996; Cos *et al.*, 2005); de modo que el glicerol vaya sustituyéndose poco a poco con metanol, se consigue así que las células desrepriman e induzcan pAOX1 aumentando la actividad AOX paulatinamente y evitando su intoxicación por el alcohol (Jahic, 2003). Con cepas Mut⁺ un pulso de metanol y sorbitol resulta suficiente (Ramón *et al.*, 2007). Esta etapa también se traduce en una disminución de la tasa específica de crecimiento a medida que disminuye la concentración del glicerol lo que permite una transición suave a la siguiente etapa (Jahic, 2003). Es interesante resaltar que si el pH y la temperatura de producción es distinta a la de crecimiento previo se puede usar esta etapa de transición para ir progresivamente ajustándolos a los valores deseados pues se trata de parámetros críticos para la expresión proteica (Zhang *et al.*, 2007).
- iii) Fase de inducción: en esta fase la tasa de consumo de metanol está determinada por la demanda de oxígeno a elevada densidad celular al mismo tiempo que la tasa de consumo de oxígeno está limitada por el rápido incremento en la actividad AOX. En las etapas anteriores se ha generado

-Introducción-

biomasa AOX-desreprimida, el comienzo de esta fase de inducción es crítica porque la actividad AOX es todavía baja y el metanol puede acumularse fácilmente. *P. pastoris* es sensible a altas concentraciones residuales de metanol y una acumulación repentina puede suponer la pérdida de la actividad AOX e incluso la muerte celular debido a la toxicidad del metanol (Ellis *et al.*, 1985). Por ello, durante esta fase resulta primordial el control de la concentración de metanol. En cultivos con la cepa Mut^s se recomienda que el metanol esté a una concentración inferior a 3 g L⁻¹ (InvitrogenTM, 2002b; Rosenfeld, 1999) e independientemente del fenotipo se aconseja que su concentración sea menor de 4 g L⁻¹ (Cos *et al.*, 2006b). En esta etapa la biomasa generada depende de la tasa de adición de metanol, que está limitada a su vez por la tasa de transferencia de oxígeno, de modo que a mayores tasas de adición de metanol mayores densidades celulares y se pueden lograr mayores concentraciones del producto de interés (Cos *et al.*, 2006b; Jahic, 2003). Se suele comenzar añadiendo metanol a una tasa lenta para facilitar la aclimatación de las células; después, la tasa de adición de metanol se ajusta periódicamente hasta que se obtiene la tasa de crecimiento deseada (Lin-Cereghino *et al.*, 2002). Por ello, la estrategia adoptada en esta fase está también directamente vinculada a la tasa específica de crecimiento, que es de los parámetros más importantes para maximizar la producción de proteínas heterólogas, ya que todas las reacciones bioquímicas para la producción están ligadas de forma directa o indirecta al crecimiento celular (Minning *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000). Pero esta producción depende también de las condiciones operacionales a las que se realicen las fermentaciones (medio de cultivo, temperatura, pH,...), del fenotipo de la levadura y de las características específicas del producto. Asimismo, la síntesis, el procesamiento y secreción de la proteína pueden afectar igualmente al crecimiento de la levadura (Cos *et al.*, 2006b) al cambiar la capacidad de las células de asimilar el metanol lo que resulta en un periodo de adaptación (que en cierta medida hace que se prolongue la fase de transición) y una menor tasa de consumo de metanol, lo cual le sucede más a las cepas Mut⁺ (Zhang *et al.*, 2007). A veces con cepas Mut^s y algunas Mut⁺ se usa una estrategia de adición mixta de glicerol y metanol, sobre todo cuando el producto recombinante resulta tóxico para la célula (Zhang *et al.*, 2007). Al contrario que con *E. coli*, al operar en modo discontinuo alimentado con *P. pastoris* la productividad específica parece ir declinando lentamente, esto hace que se pueda prolongar la producción al extender el tiempo del proceso (Charoenrat *et al.*, 2005; Jahic *et al.*, 2002).

Para proteínas intracelulares el pico de producción en *P. pastoris* suele producirse en 24 h, mientras que para las extracelulares suele ser de entre 24-100 h en metanol, dependiendo de las características de la cepa (Mut⁺ o Mut^s) y de la proteína heteróloga (su tasa de acumulación en el medio, su estabilidad estructural y resistencia a proteasas del medio,...) (Lin-Cereghino *et al.*, 2001).

La materia prima generada a partir de bioprocesos con *P. pastoris* se caracteriza por un alto contenido celular, hasta un 50% de peso húmedo celular (≥ 150 g/L peso seco celular), lo que dificulta su procesamiento posterior (Jahic *et al.*, 2002), y un alto contenido en sales debido a las características del medio de cultivo empleado (Invitrogen) que presenta una conductividad de 15-20 mS/cm (Charoenrat *et al.*, 2006). Este medio se diseñó en los años 70 cuando se usaba a la levadura para la producción de proteína unicelular (SCP) y no se necesitaba una separación del producto. Para la separación de las células del crudo se suele recurrir a técnicas de centrifugación y filtración. En procesos a gran escala se suelen emplear diferentes separadores centrífugos continuos dependiendo del peso húmedo y la consistencia celular de la materia prima; a baja escala, se ha estudiado la filtración, si bien resulta algo problemática, el uso de microfiltración (0,45 μ m) en modo de diafiltración parece una buena alternativa. Para aumentar la eficiencia del procesamiento de la materia prima generada en estos bioprocesos se ha estudiado la recuperación integrada del producto que combina la separación sólido-líquido con un fraccionamiento inicial. Dos técnicas que permiten esto son la partición en sistema acuoso de dos fases (ATPSs), aunque suele necesitar un paso adicional de cromatografía de intercambio iónico para tener una mayor calidad del

producto, y la absorción en cama expandida (EBA) que permiten una captura rápida de la proteína recombinante reduciendo el tiempo de posible degradación proteolítica (Jahic *et al.*, 2006)

Aunque el sistema *P. pastoris* es más costoso en tiempo y dinero de desarrollar que los basados en *E. coli*, una vez puestos a punto los costes de producción de proteínas recombinantes son comparables. La productividad específica del sistema es generalmente baja pero se compensa con las altas densidades celulares que se logran. El verdadero ahorro se produce en los costes de purificación del producto y las licencias y *royalties* de cepas y vectores comunes al desarrollar aplicaciones comerciales. Obviamente, el método de cultivo va a afectar a la eficiencia y consecuentemente a la viabilidad económica por lo que hay que estudiar en profundidad el diseño del sistema a emplear. Por ejemplo, debido al menor precio del glicerol respecto de la glucosa y sus perfiles de crecimiento semejantes, parece más atractivo desde un punto de vista económico usar el glicerol, a lo que se le une el hecho de la existencia de fuentes baratas de éste como el descartado durante la producción de biodiesel y que se puede usar sin ningún refinamiento. Los gastos en electricidad, agua y servicios necesarios son el 20-30% de los gastos de operación en cada proceso, pero existen diferencias en cuanto a costes de manufacturación que suelen ser un 28% inferiores fuera de los EEUU. En general, dados los resultados obtenidos con este sistema suele considerarse de bajo coste. El problema para que se instaure como un sistema estándar de producción es la producción de proteasas, la pureza del producto producido (pues para usos terapéuticos o consumo humano se les exige un alto nivel de pureza lo que hace que los sistemas de expresión basados en levaduras sean económicamente onerosos comparados con los sistemas GRAS, *Generally Regarded As Safe*, como las microalgas), otro problema es el uso del metanol en sistemas con pAOX1, no sólo por la toxicidad y problemas de almacenamiento y manejo del metanol, sino también por la dificultad de controlar su concentración a medida que se aumenta la escala de producción, lo cual resulta difícil (Potvin *et al.*, 2012).

1.6. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LIPASAS/ESTEROL ESTERASAS

Ya se ha comentado que las lipasas son un grupo de enzimas de alto valor biotecnológico por la versatilidad de sus propiedades y la facilidad de su producción en masa. En el caso de las microbianas estas características son aún más notables y las hace muy atractivas para su uso industrial (Hasan *et al.*, 2006).

De acuerdo a las reacciones que pueden catalizar este tipo de enzimas (sección 1.3.5) se pueden encontrar una gran variedad de aplicaciones industriales para ellas (Anobom *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2006); desde aplicaciones medioambientales que tienen que ver con la industria oleoquímica, la producción de polímeros biodegradables, la industria textil, la industria de los detergentes, tratamiento de efluentes residuales, la biodegradación de aceites, la industria papelera y la producción de biocombustibles (biodiesel); pasando por la industria alimentaria para el procesamiento de alimentos, mejora de sus aromas y calidad (lácteos, panadería y té); aplicaciones en la industria médico-farmacéutica como herramientas de diagnóstico y para la resolución de mezclas racémicas; y hasta en la industria cosmética.

En esta sección se van a abordar más en detalle dos posibles aplicaciones biotecnológicas de este tipo de enzimas y para las que se ha estudiado la idoneidad de la esterol esterasa de *O. piceae*, ya sea nativa o recombinante.

1.6.1. Disminución de los problemas de *stickies* durante la producción de papel reciclado

La producción de papel reciclado ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Uno de los problemas no resuelto de esta industria proviene de la deposición de mezclas pegajosas que engloban residuos de adhesivos, aglutinantes de recubrimiento, residuos de tinta, productos químicos de destintado, y derivados de la madera. Estos depósitos, generalmente conocidos como *stickies*, están formados por una amplia gama de compuestos que incluyen compuestos de alto y bajo peso molecular orgánicos, polímeros naturales y sintéticos y productos químicos inorgánicos. La presencia de estos depósitos en las pulpas de papel y aguas de proceso es perjudicial para la producción del papel reciclado ya que afecta a la eficiencia

-Introducción-

del proceso y la calidad del producto final, lo que resulta en graves pérdidas económicas. El acetato de polivinilo (PVAc) es un componente común de muchos adhesivos o pegamentos (**figura. 1.17**), y constituye uno de los compuestos más problemáticos de los *stickies* (Miranda *et al.*, 2008).

El PVAc y su correspondiente alcohol (PVA) son polímeros que presentan un esqueleto carbono-carbono unido por enlaces sencillos y también una estructura de tipo 1,3-diol (Amann y Minge, 2012). Se sabe que el PVAc se puede someter a una reacción de hidrólisis por la rotura de la cadena lateral (Chattopadhyay *et al.*, 2003); en otras palabras, la hidrólisis enzimática del polímero consiste en una reacción de desacetilación, dando ácido acético y alcohol polivinílico (PVA) que es más hidrosoluble que PVAc (Leja y Lewandowicz, 2010).

Existen en el mercado enzimas de tipo esterasa para utilizarlas específicamente contra los *stickies*, la más conocida es la llamada Optimize® cuyo uso para tal fin está patentado por Buckman (<http://www.buckman.com>) y que recibió en el año 2004 el *Greener Reaction Conditions Award* de la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense.

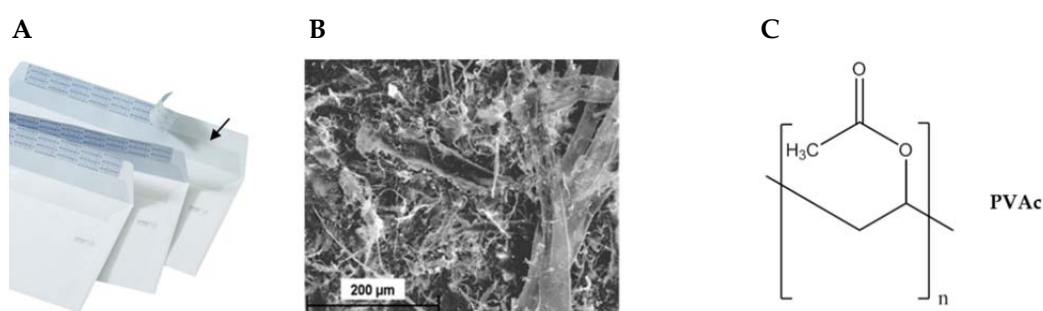


Figura 1.17. Problemática del PVAc en la producción de papel reciclado. Ejemplo de materia prima para la producción de papel reciclado donde se indica que la banda adhesiva puede ser causa de *stickies* (A). Depósito en papel reciclado analizado por microscopía electrónica de barrido (Miranda *et al.*, 2008) (B). Fórmula del acetato de polivinilo (C).

1.6.2. Síntesis de ésteres de esteroides vegetales como nutraceuticos

El ritmo de vida actual con tendencia al sedentarismo y el aumento en el consumo de grasas saturadas ha provocado que una gran parte de la población presente niveles de colesterol en suero elevados, facilitando el desarrollo de aterosclerosis, y aumentando, por ello, las probabilidades de sufrir isquemias. A esto hay que unirle aquellas personas que presentan deficiencias a nivel del metabolismo del colesterol y padecen hipercolesterolemia. El exceso de colesterol se puede considerar como una auténtica pandemia que ya en el año 2.002 causó unos 4,4 millones de muertes según la OMS.

Los esteroides vegetales o fitoesteroides, y por extensión sus derivados saturados los fitoestanoles, tienen una estructura química común a la del colesterol, derivando del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno. Sin embargo, estudios realizados en la última década han puesto de manifiesto su capacidad para disminuir los niveles de colesterol sérico de tipo LDL (lipoproteína de baja densidad) disminuyendo la probabilidad de desarrollar placas de ateroma. Aunque no se conoce en su totalidad su mecanismo de acción, algunos estudios ponen de manifiesto que podrían reducir la absorción de colesterol en el intestino, al desplazarlo de las micelas digestivas (Chen *et al.*, 2008; Plat y Mensink, 2005) (**figura 1.18**).

-Esterasa versátil-

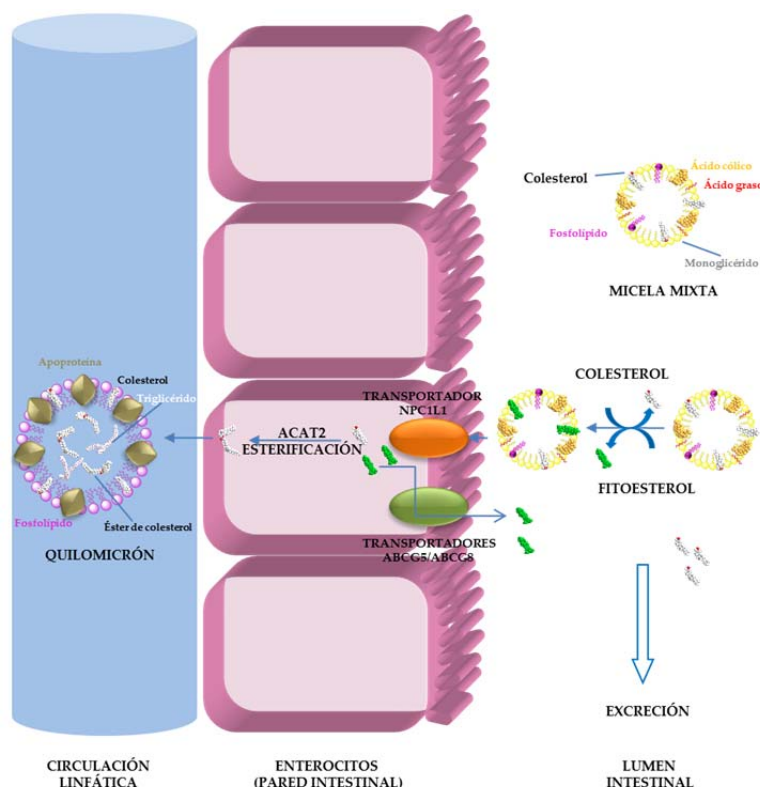


Figura 1.18. Acción de los fitoesteroides a nivel intestinal. Los esteroides/estanoles vegetales desplazan de las micelas a la mayor parte de las moléculas de colesterol que finalmente son excretadas. Por otro lado existe un reciclaje de moléculas de esteroides/estanoles a nivel del enterocito que vuelven a ser secretadas al lumen intestinal para su reutilización. Finalmente, las pocas moléculas de colesterol que fueron transportadas al enterocito se esterifican en éste para su eliminación por vía linfática a través de la formación de los quilomicrones. Basado en Chen *et al.*, 2008; Plat y Mensink, 2005.

Por tanto, el consumo de fitoesteroides y fitoestanoles podría amortiguar y ayudar a prevenir los niveles altos de colesterol en la población pero al no ser sintetizados por el organismo, han de ser incorporados en la dieta, mediante la ingestión de frutas y vegetales o de productos enriquecidos en ellos (Chen *et al.*, 2008). Sin embargo, uno de los principales problemas para su incorporación en diferentes alimentos (principalmente derivados lácteos o de aceites vegetales) ha sido su alto punto de fusión y baja solubilidad. Una solución es esterificar los esteroides y estanoles libres con ácidos grasos de interés para aumentar su solubilidad (Thompson y Grundy, 2005; Villeneuve *et al.*, 2005). Ha sido demostrada mayor eficacia en reducir la absorción de colesterol a nivel intestinal con una dieta suplementada con fitoesteroides esterificados que con fitoesteroides libres (Weber *et al.*, 2002).

Uno de los primeros productos enriquecidos que comenzó a comercializarse en el año 1995 bajo la marca Benecol® es una margarina que incorpora un éster de estanol y cuyo lanzamiento al mercado fue consecuencia de la patente creada por la compañía finlandesa Raisio (Thompson y Grundy, 2005).

Cabe destacar que de los extensos estudios realizados para la evaluación de seguridad de esteroides y estanoles vegetales, con varios modelos animales e incluso celulares, a lo largo de los últimos años, ninguno ha revelado efecto adverso alguno para la salud. Por esta razón, se les considera como sustancia GRAS tanto por los organismos regulatorios estadounidenses (FDA) como por los europeos (Thompson y Grundy, 2005).

La reacción de síntesis de estos compuestos es el punto clave para su obtención pudiendo ser ésta química o enzimática. Sin embargo, el gran gasto de energía que suponen los procesos de síntesis química, que suelen desarrollarse a altas temperaturas, junto con la formación de productos aterogénicos y

-Introducción-

citotóxicos hace que se sigan buscando catalizadores alternativos y entre ellos los biocatalizadores enzimáticos, concretamente lipasas y esterol esterases, pueden tener un papel importante (Villeneuve *et al.*, 2005).

Dentro de las reacciones enzimáticas que se emplean para la síntesis de ésteres de esteroides/estanoles vegetales éstas pueden transcurrir mediante:

- i) Transesterificación tal y como se describe en la patente US 2004/0105931 A1 (Basheer y Plat, 2004). En este caso las reacciones transcurren *in situ* por lo que los alimentos enriquecidos en este tipo de compuestos estarían limitados a aquéllos que entre sus constituyentes contuvieran de forma natural triglicéridos como moléculas “donadoras” del grupo acilo; es decir, del ácido graso. En concreto, serían susceptibles de enriquecimiento derivados lácteos como la mantequilla, los yogures y los quesos o aceites de diverso origen (oliva, girasol, colza, etc.).
- ii) Por contraste, en otros trabajos y patentes se describe la obtención de estos compuestos mediante esterificación directa de fitoesteroides con ácidos grasos, en diferentes condiciones experimentales empleando como biocatalizador preparados enzimáticos comerciales de *C. rugosa*. (Norinobu *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2011; Villeneuve *et al.*, 2005; Vu *et al.*, 2004).

1.7. OBJETIVOS

Este trabajo está centrado en el estudio de la enzima esterol esterasa secretada por el hongo ascomiceto *O. piceae*. Los objetivos planteados se exponen a continuación:

1. Llevar a cabo la expresión heteróloga de la esterol esterasa de *O. piceae* en diferentes cepas de la levadura metilotrófica *P. pastoris* para estudiar su producción a escala de Erlenmeyer y de biorreactor.
2. Caracterizar y comparar las propiedades bioquímicas y cinéticas de la enzima recombinante con las de la enzima nativa.
3. Estudiar el potencial biotecnológico de las enzimas nativa y recombinante en nuevas aplicaciones basadas en reacciones de hidrólisis y de síntesis.
4. Estudiar el papel de la inmovilización de la enzima para su aplicación industrial.
5. Cristalizar la enzima para el conocimiento de su estructura tridimensional y cómo explica ésta sus propiedades.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MICROORGANISMOS

2.1.1. Cepas fúngicas

Las principales características de las cepas fúngicas empleadas para este trabajo se detallan en la **tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Cepas fúngicas

Nombre	Características	Fuente
<i>O. piceae</i>		IJFM 237 (= CECT 204116*)
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i> Mut ⁺	Invitrogen™
<i>P. pastoris</i> KM71	<i>his4</i> Mut ^s	Invitrogen™

IJFM: Instituto Jaime Ferrán de Microbiología (CIB-CSIC); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (*cepa depositada bajo protección de patente); Invitrogen™, La Jolla, California.

2.1.2. Cepas bacterianas

Las características de la única cepa bacteriana empleada para este trabajo se detallan en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Cepa bacteriana

Nombre	Características	Fuente
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Stratagene®

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Por norma general, los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min aunque aquellos con glucosa se esterilizaron a 110 °C, 30 min. En casos concretos, algunos componentes del medio se esterilizaron por filtración, como se irá indicando.

2.2.1. Medios de cultivo para bacterias

- Medio Luria-Bertani (LB): para el mantenimiento y propagación de *E. coli* (**tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Composición del medio LB

Componentes	g/L
Tryptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5

Para preparar el medio sólido se añade agar a una concentración de 15 g/L. Para la selección de transformantes, una vez autoclavado el medio y atemperado a ~50 °C, se añade ampicilina, esterilizada por filtración (0,22 μm), a la concentración adecuada según se trate de medio sólido o líquido (50 y 100 μg/mL, respectivamente).

- Medio Ψ *broth*: para crecimiento de transformantes (**tabla 2.4**).

-Materiales y métodos-

Tabla 2.4. Composición del medio Ψ broth

Componentes	g/L
Triptona	20
Extracto de levadura	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4
KCl	7,5
Ajustar el pH a 7,6 con KOH 1N	

2.2.2. Medios de cultivo para hongos filamentosos

- Medio agar-malta: para el mantenimiento y conservación de *O. piceae* (tabla 2.5).

Tabla 2.5. Composición del medio agar-malta

Componentes	g/L
Agar	20
Extracto de malta	20

- Medio *Czapeck-Dox* modificado (medio basal): para el crecimiento de *O. piceae* y producción de la enzima en medios líquidos. En este último caso el medio fue suplementado con aceite de oliva (Sigma-Aldrich) al 0,5% (v/v) como inductor de la producción de enzima (tabla 2.6).

Tabla 2.6. Composición del medio *Czapeck-Dox* modificado

Componentes	g/L
Glucosa	10
Peptona	5
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	2
KH ₂ PO ₄	1
SO ₄ Mg·7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Extracto de levadura	1
	mL/L
Elementos traza (tabla 2.7)	1

Tabla 2.7. Composición de la solución de elementos traza

Componentes	mg/L
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	70
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10

2.2.3. Medios de cultivo para *P. pastoris*

Todos los medios de esta sección, a excepción del medio YEPS y los medios de producción en biorreactor, se prepararon de acuerdo con las directrices del manual *A manual of methods for expression of recombinant proteins in P. pastoris* (Invitrogen™, 2002a):

2.2.3.1. Medio de mantenimiento

- Medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*): permite el mantenimiento y propagación de las distintas cepas y transformantes de *P. pastoris* (tabla 2.8).

Tabla 2.8. Composición del medio YPD

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20

Para la preparación de YPD sólido se añadió agar a una concentración de 20 g/L.

2.2.3.2. Medios de selección

- Medio RDB (*Regeneration Dextrose Base medium*) y RDHB (*Regeneration Dextrose Histidin Base medium*): permiten la recuperación de esferoplastos, una vez transformados con el vector de interés, y evaluar el genotipo de éstos para la auxotrofia a histidina (tabla 2.9).

Tabla 2.9. Composición de los medios RDB y RDHB

Componentes	g/L
Sorbitol	182,2
Glucosa	20
^a YNB con (NH ₄) ₂ SO ₄ sin aminoácidos	13,4
Biotina	4·10 ⁻⁴
Histidina (sólo RDHB)	0,04
Solución de aminoácidos (tabla 2.10)	0,05
Agar	20

^aYNB (*Yeast Nitrogen Base*, Difco)

Sólo el sorbitol, la glucosa y el agar fueron autoclavados. El resto de los componentes se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se añadieron al medio una vez atemperado a ~50 °C.

La preparación de los medios con 10 g/L de agar da lugar a los medios de cobertura RD y RDH.

Tabla 2.10. Composición de la solución de aminoácidos del medio RDB y RDHB

Componentes	g/L
L-glutámico	5
L-metionina	5
L-lisina	5
L-leucina	5
L-isoleucina	5

-Materiales y métodos-

- Medios MM (*Minimal Methanol*) y MD (*Minimal Dextrose*): empleados para la selección del fenotipo de los transformantes: Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) o Mut^s (*Methanol utilization slow*) (**tabla 2.11**).

Tabla 2.11. Composición de los medios MM y MD

Componentes	g/L
Metanol (sólo medio MM)	5
Glucosa (sólo medio MD)	20
YNB con (NH ₄) ₂ SO ₄ , sin aminoácidos	13,4
Biotina	4·10 ⁻⁴
Agar	15

Sólo la glucosa y el agar fueron autoclavados. El resto de los componentes se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se añadieron al medio una vez atemperado a ~50 °C.

2.2.3.3. Medios de crecimiento y expresión en Erlenmeyer

- Medios BMGY (*Buffered Complex Glycerol medium*) y BMMY (*Buffered Complex Methanol medium*). Ambos son medios complejos tamponados que se emplean para la producción de la enzima recombinante en dos etapas: una primera de obtención de biomasa en medio BMGY y una segunda etapa de inducción en medio BMMY (**tabla 2.12**).

Tabla 2.12. Composición de los medios BMGY y BMMY

Componentes	g/L
Tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,0	-
Extracto de levadura	10
Peptona	20
YNB con (NH ₄) ₂ SO ₄ sin aminoácidos	13,4
Biotina	4·10 ⁻⁴
Glicerol (sólo BMGY)	10
Metanol (sólo BMMY)	5

YNB, biotina y metanol se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se añadieron al medio autoclavado y atemperado a ~50 °C. Cada 24 h de cultivo en fase de inducción se añadió metanol (5 g/L) para mantener su concentración y contrarrestar la evaporación.

- Medios BMG (*Buffered Minimal Glycerol medium*) y BMM (*Buffered Minimal Methanol medium*). Ambos son medios mínimos tamponados que se utilizan para la producción de la enzima recombinante en dos etapas: una primera de obtención de biomasa en medio BMG y una segunda etapa de inducción en medio BMM (**tabla 2.13**).

-Esterasa versátil-

Tabla 2.13. Composición de los medios BMG y BMM

Componentes	g/L
Tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,0	-
YNB con (NH ₄) ₂ SO ₄ sin aminoácidos	13,4
Biotina	4·10 ⁻⁴
Glicerol (sólo BMGY)	10
Metanol (sólo BMMY)	5

YNB, biotina y metanol se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se añadieron al medio autoclavado y atemperado a ~50 °C. Cada 24 h de cultivo, en fase de inducción, se añadió metanol (5 g/L) para mantener su concentración y contrarrestar la evaporación.

- Medios MGY (*Minimal Glycerol medium*) y MM (**tabla 2.11**, sin agar). Ambos son medios mínimos sin tamponar que se utilizan para la producción de la enzima recombinante en dos etapas: una primera de obtención de biomasa en medio MGY y una segunda etapa de inducción en medio MM. La composición del medio MGY se encuentra detallada en la **tabla 2.14**.

Tabla 2.14. Composición del medio MGY

Componentes	g/L
YNB con (NH ₄) ₂ SO ₄ sin aminoácidos	13,4
Biotina	4·10 ⁻⁴
Glicerol	10

YNB y biotina se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se añadieron al medio autoclavado y atemperado a ~50 °C.

- Medio YEPS (*Yeast Extract Peptone Sorbitol medium*): medio complejo tamponado para la producción de enzima recombinante (**tabla 2.15**).

Tabla 2.15. Composición del medio YEPS

Componentes	g/L
Tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,0	-
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Sorbitol	10
Metanol	5

Cada 24 h de cultivo, en fase de inducción, se añadió metanol (5 g/L) puro para mantener su concentración y contrarrestar la evaporación.

La preparación de este medio sin sorbitol ni metanol constituye el medio YEP.

2.2.3.4. Medios de crecimiento y expresión en fermentador

Los medios de cultivo empleados para el escalado en la producción heteróloga de la enzima en *P. pastoris* son medios sintéticos de composición perfectamente definida.

- Medio de cultivo para bioprocesos en discontinuo: se empleó de forma general el medio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) cuya composición se detalla en la **tabla 2.16**.

-Materiales y métodos-

Tabla 2.16. Composición del medio YNB

Componente	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
YNB sin aminoácidos ni (NH ₄) ₂ SO ₄	3,4
Metanol	10
Sorbitol (sólo en la cepa Mut ^s)	10
	mL/L
Solución de micronutrientes PTM ₁ (tabla 2.17)	4,35
Antiespumante 204	0,1

El pH fue controlado a 5,5 con KOH 5M. YNB, metanol y la solución PTM₁ fueron esterilizados por filtración (0,22 µm) y añadidos al fermentador a la temperatura de trabajo.

Tabla 2.17. Composición de la solución de micronutrientes PTM₁

Componente	g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6
NaI	0,08
MnSO ₄ ·H ₂ O	3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,2
H ₃ BO ₃	0,02
CoCl ₂	0,5
ZnCl ₂	20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	65
Biotina	0,3
	mL/L
H ₂ SO ₄ concentrado	5

- Medio de cultivo para bioprocesos en discontinuo alimentado de elevada densidad celular: se empleó un medio basal sintético (MBS) formulado por Invitrogen™ (Invitrogen™, 2002b), cuya composición aparece en la **tabla 2.18**.

Tabla 2.18. Composición del medio MBS-Invitrogen™

Componente	g/L
CaSO ₄ ·2H ₂ O	1,17
K ₂ SO ₄	18,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,9
KOH	4,13
Glicerol	40
	mL/L
H ₃ PO ₄ (85%)	26,7
Solución de micronutrientes PTM ₁	4,35
Antiespumante 204	0,1

El pH del medio fue controlado a 5,5 con KOH 5M durante la fase de crecimiento en discontinuo e inicio de la etapa de transición y con NH₄OH al 30% (v/v) durante el final de ésta y la fase de inducción. La solución PTM₁ se esterilizó por filtración y se añadió al fermentador a la temperatura de trabajo.

-Esterasa versátil-

Este medio también se usó para bioprocesos en discontinuo para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa Mut^s, desestimando el glicerol por sorbitol a una concentración de 10 g/L y añadiendo el volumen necesario de metanol para establecer una concentración de 10 g/L.

Todos los medios de cultivo sólidos fueron plaqueados tras ser autoclavados, conservándose las placas a 4 °C varios meses.

En cuanto a los medios líquidos, aquellos más generales se mantuvieron a temperatura ambiente durante varios meses, mientras que los medios empleados para el crecimiento e inducción de *P. pastoris* a escala Erlenmeyer y biorreactor se conservaron a 4 °C durante un máximo de dos meses. Las soluciones de aminoácidos, biotina, YNB y PTM₁ empleadas para la elaboración de los medios anteriores se conservaron a 4°C hasta un año.

En la **tabla 2.19** se muestra una recopilación de los medios de cultivo empleados en este trabajo y sus principales características.

Tabla 2.19. Recopilación de los medios de cultivo empleados

Microorganismo	Medio	Aplicación	Composición
<i>E. coli</i> DH5 α	Luria-Bertani (LB)	Mantenimiento y crecimiento	Tabla 2.3
	Ψ broth	Crecimiento transformantes	Tabla 2.4
<i>O. piceae</i>	Agar malta	Mantenimiento	Tabla 2.5
	Czapeck-Dox modificado	Crecimiento y producción de la esterol esterasa	Tabla 2.6
<i>P. pastoris</i>	YPD	Mantenimiento y crecimiento	Tabla 2.8
	RDB/RDHB	Selección transformantes auxótrofos para histidina	Tabla 2.9
	MM/MD	Selección del fenotipo Mut ⁺ o Mut ^s de los transformantes	Tabla 2.11
	BMGY/BMMY	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.12
	YEPS	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.15
	BMG/BMM	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.13
	MGY/MM	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.14
	YNB	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.16
	MBS-Invitrogen™	Producción esterol esterasa recombinante	Tabla 2.18

2.3. MANTENIMIENTO DE CEPAS

2.3.1 Mantenimiento de cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* DH5 α , transformada con las distintas construcciones obtenidas, se conservó a corto plazo a 4 °C en placas de LB-Ampicilina. Para su mantenimiento a largo plazo se dispusieron gliceroles a partir de cultivos *overnight* (*o/n*) en medio líquido LB. 1 mL de este cultivo se centrifugó 1 minuto a 8.000 rpm y el sedimento bacteriano se resuspendió en 800 μ L de medio LB y 200 μ L de glicerol al 87%. Los gliceroles se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C.

2.3.2. Mantenimiento de cepas fúngicas

El hongo *O. piceae* se mantuvo durante resiembras periódicas tanto en medio líquido (medio basal) como en medio sólido (agar extracto de malta) a 4 °C. Para su conservación a largo plazo se prepararon gliceroles, a partir de cultivos líquidos crecidos en medio basal. En fase estacionaria, estos cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en medio basal con glicerol al 15% (v/v), se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C.

Las diferentes cepas de *P. pastoris* se mantuvieron a 4 °C mediante resiembra periódica en placas de YPD (para varias semanas) y en tubos de agar inclinado (durante varios meses). Para un mantenimiento a largo plazo de las cepas se realizaron gliceroles a partir de cultivos *o/n* en medio líquido YPD: las células crecidas se centrifugaron y resuspendieron en YPD con glicerol al 15% (v/v) hasta obtener una D.O.₆₀₀ de 50-100. Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C.

2.4. CONDICIONES DE CULTIVO

2.4.1. Condiciones de cultivo para *O. piceae*

El ascomiceto *O. piceae* fue cultivado en medio *Czapeck-Dox* modificado a 26-28 °C y 160-180 rpm. La biomasa procedente de cultivos de 3 días de incubación en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio fue empleada como inóculo. Estos cultivos fueron iniciados a partir de micelio del hongo crecido en placas de agar malta. Para la producción de la enzima el hongo se cultivó a partir de 4 mL de inóculo (relación 1/50) en matraces de 1L conteniendo 200 mL de medio basal suplementado con aceite de oliva al 0,5% (v/v).

2.4.2. Condiciones de cultivo para *E. coli*

Las bacterias se crecieron en medio líquido (LB o Ψ broth) suplementado con ampicilina, a 37 °C y 150 rpm, en un baño de agua Julabo SW22. En general, los cultivos bacterianos se prepararon en tubos Falcon™, respetando la relación de 1/5 de volumen de medio con respecto al volumen del tubo.

En medio sólido se crecieron a 37 °C en placas de Petri conteniendo LB suplementado con ampicilina a la concentración especificada en el apartado 2.2.1.

2.4.3. Condiciones de cultivo para *P. pastoris*

La temperatura empleada para el crecimiento de la levadura fue habitualmente de 28-30 °C ya que a temperaturas superiores el nivel de expresión heteróloga disminuye fuertemente en este sistema.

2.4.3.1. Condiciones de cultivo de la cepa recombinante GS115 (His⁺Mut⁺)

Para la producción de enzima recombinante la cepa de *P. pastoris* His⁺Mut⁺ se cultivó en los medios de cultivo BMGY/BMMY, BMG/BMM, MGY/MM y YEPS.

En el caso de las tres primeras parejas de medios, colonias aisladas de la levadura crecida en placas de YPD fueron usadas como inóculo para sembrar Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 25 mL de BMGY, BMG o MGY. Estos cultivos se mantuvieron a 28 °C, 275 rpm, *o/n* para alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 2-6. Las células crecidas se cosecharon por centrifugación (centrífuga Sorvall® RC 5C plus, Thermo Scientific), a 3.500-5.000 rpm, 5 min y temperatura ambiente, y se resuspendieron en 100-200 mL de los medios BMMY, BMM o MM, para lograr una D.O.₆₀₀ de aproximadamente 1,0. Tras ello, los cultivos se continúan en matraces de 1 L a 275 rpm y 28 °C, sacando muestras periódicas para ver la producción de la enzima (hasta 7 días). Cada 24 h de cultivo fue necesario añadir a los matraces metanol (ver apartado 2.2.3.3) y así mantener la inducción del pAOX1 y favorecer la expresión de la esterasa recombinante.

En el caso del medio YEPS no fue necesario realizar un cultivo en 2 etapas con diferentes medios, tan sólo se preparó desde placa un preinóculo de 10 mL en medio YEPS, sin inductor, en Falcon™ de 50 mL y se dejó crecer 24 h a 28 °C y 275 rpm. Éste se utilizó directamente para inocular el medio con el inductor. Los cultivos se hicieron en matraces de 1 L conteniendo 100 mL del medio y cada 24h se añadió metanol para mantener la inducción.

2.4.3.2. Condiciones de cultivo de la cepa recombinante KM71 (His⁺Mut^s)

A partir de colonias únicas aisladas de la cepa en medio YPD se inocularon matraces de 1 L conteniendo 100 mL de medio BMG y el cultivo se creció a 230 rpm, 28 °C, 24 horas hasta una D.O.₆₀₀ de 20-60. Después, las células se centrifugaron a 4.500 rpm a temperatura ambiente, 10 min y el sedimento celular se resuspendió en 60 mL de medio BMM, con y sin sorbitol (10 g/L), para mantener una D.O. entre 20-60. Este volumen se alicuotó en tubos Falcon™ de 50 mL, a razón de 10 mL de medio/tubo, para tener triplicados que se incubaron durante 96 h a 28 °C y 230 rpm. Cada 24 horas se añadió a los cultivos metanol y a aquellos que contenían sorbitol se les añadió éste a la concentración especificada anteriormente.

A diferencia de la cepa His⁺Mut⁺, esta cepa sólo se creció en este medio como etapa preliminar al escalado de la producción en reactor donde se emplean medios mínimos y las cepas Mut^s suelen ser más ventajosas desde un punto de vista operacional.

2.5. TAMPONES Y SOLUCIONES

Generalmente, los tampones se prepararon a partir del ácido o la base correspondiente a la molaridad deseada, tras lo cual el pH se ajustó con soluciones de NaOH o HCl 10 N, respectivamente.

La composición de otros tampones y su utilidad se detalla en la **tabla 2.20**.

-Materiales y métodos-

Tabla 2.20. Tampones y soluciones

Aplicación	Tampón o solución	Composición
Manipulación de ácidos nucleicos	HSE	HEPES 20 mM, pH 6,9; sacarosa 0.5 M, EDTA 20 mM, pH 8,0
	¹ TEA	Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0
	² TEB	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0
	TAE 50X	Tris-acetato 2M, EDTA 50 mM pH 8,0
Obtención de competentes de <i>E. coli</i>	TFB I	RbCl 100 mM; MnCl ₂ 50 mM; CH ₃ COOK 30 mM; CaCl ₂ 10 mM; glicerol 15% (v/v)
	TFB II	MOPS 10 mM pH 7,0; RbCl 10 mM; CaCl ₂ 75 mM; glicerol 15% (v/v)
Transformación de <i>P. pastoris</i>	SE	Sorbitol 1 M; EDTA 25 mM, pH 8,0
	STE	Sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH 8,0
	CaS	Sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl ₂ 10 mM
	CaT	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; CaCl ₂ 20 mM
	SOS	Sorbitol 1 M; YPD 0,3X; CaCl ₂ 10 mM
Caracterización de enzimas	³ CFB	Solución A: H ₃ PO ₄ 33,3 mM; C ₆ H ₈ O ₇ 33,3 mM; H ₃ BO ₃ 66 mM; NaOH 334 mM Solución B: HCl 100 mM Mezclar A y B en cantidades adecuadas para obtener los diferentes pH de trabajo (Geigy, 1965)

¹TEA: Tampón de elevada fuerza iónica para resuspender ADN

²TEB: Tampón de baja fuerza iónica para resuspender ADN

³CFB: tampón citrato-fosfato-borato

2. 6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

2.6.1. Determinación del pH

El pH se midió con un pH-metro modelo BasiC 20 (Crison), empleando los electrodos Hamilton P/N 238000/08 para soluciones y Crison Cat. N° 52-07 para geles de acrilamida.

2.6.2. Determinación de la biomasa en medio líquido

2.6.2.1. Medida del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se valoró espectrofotométricamente mediante la medida de la dispersión generada a 550 nm. Una unidad de densidad óptica a dicha longitud de onda corresponde a $1,9 \cdot 10^8$ células/mL.

2.6.2.2. Medida del crecimiento fúngico

En el caso de *P. pastoris*, la biomasa se obtuvo a partir de medidas de peso seco celular y D.O.₆₀₀ (una unidad de D.O.₆₀₀ $\sim 5 \cdot 10^7$ células/mL), correlacionando ambas medidas mediante una recta de calibrado. En el apartado 2.11.4.1 se detalla el procedimiento empleado.

En cuanto a *O. piceae*, el crecimiento se estimó también a partir del peso seco y de la D.O.₆₀₀ a los diferentes días de incubación. La separación de la biomasa del crudo se realizó por centrifugación, a temperatura ambiente, 13.000 rpm, 5 min. Tras ello, el precipitado obtenido se secó a 60 °C hasta estabilizar su peso en unas 24 horas.

2.6.3. Valoración de sustancias reductoras

Durante la producción de enzima nativa las sustancias reductoras (SR) se valoraron mediante el método de Somogyi y Nelson (Somogyi, 1945), basado en la oxidación selectiva de este tipo de compuestos mediante reactivos de naturaleza cúprica en condiciones altamente alcalinas. El cambio de oxidación en el ión cúprico es revelado por la adición de iones molibdato, cuya oxidación se sigue a 540 nm.

Los reactivos empleados y su composición se exponen a continuación:

- Somogyi I: en un volumen final de 800 mL de H₂O destilada se disolvieron 144 g de Na₂SO₄, 12 g de KNaC₄H₄O₆·4H₂O, 24 g de Na₂CO₃ y 16 g de NaHCO₃.

Somogyi II: en un volumen final de 200 mL de H₂O destilada se disolvieron 6 g de Na₂SO₄ y 4 g de CuSO₄·5H₂O.

La mezcla de los reactivos I y II en proporción 4:1 da como resultado el reactivo de Somogyi empleado en los ensayos.

- Nelson: en un volumen final de 900 mL de H₂O destilada se disolvieron 50 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ y sobre estos se añadieron 42 mL de H₂SO₄. A esta solución se le añadieron 50 mL de otra formada por 6 g de Na₃AsO₄ en H₂O destilada.

El procedimiento seguido para las determinaciones fue el siguiente: a 200 µL de muestra se les añadió un volumen equivalente de reactivo de Somogyi y se agitó en vórtex. La mezcla se hirvió en un baño de agua durante 15 min. Una vez fría, se añadieron 200 µL del reactivo de Nelson y 2.400 µL de agua destilada, tras lo cual se agitó en vórtex y se leyó espectrofotométricamente la absorbancia a 540 nm. Los valores de absorbancia obtenidos, tras restar el blanco, se transformaron en equivalentes de glucosa, tras ser interpolados en una recta de regresión obtenida a partir de este monosacárido (0-1 mM), cuya respuesta fue lineal hasta un valor de A₅₄₀ de 0,7.

$$[SR] \text{ (mM)} = [(A_{540}-0,0004)/0,5982] \text{ R}^2=0,999$$

2.6.4. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el cambio del máximo de absorbancia del reactivo Coomassie de 465 nm a 595 nm, al generarse el complejo proteína-colorante.

Para medidas rutinarias se utilizó el microensayo, utilizando el reactivo de Bio-Rad para calcular la concentración proteica a partir de una recta de calibrado construida con concentraciones conocidas (1,2-10 µg/mL) de albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumine*, Sigma-Aldrich) y leyendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160-A:

$$[\text{Proteínas}] \text{ (}\mu\text{g/mL)} = [(A_{595}-b)/a] \text{ R}^2\geq 0,9$$

donde a es la pendiente de la recta y b la ordenada en el origen

Para las muestras de fermentaciones en biorreactor se emplearon ensayos en microplaca de 96 pocillos, utilizando el método de Bradford pero con el reactivo de Pierce y se recurrió tanto al protocolo estándar como al microensayo para abarcar un intervalo de concentraciones de 1-1.500 µg/mL. En cualquier caso, la concentración proteica se calculó a partir de una recta de calibrado, preparada en cada ensayo, al menos por duplicado, construida a partir de patrones de BSA (Pierce) y leyendo la A₅₉₅ en un lector de placas (*spectrophotometer microplate reader* 2001, Whittaker bioproducts).

-Materiales y métodos-

$$[\text{Proteínas}] (\mu\text{g/mL}) = [a \cdot (A_{595})^2 + b \cdot (A_{595}) + c] R^2 \geq 0,9$$

donde a es el coeficiente cuadrático; b el coeficiente lineal y c la ordenada en el origen

2.6.5. Valoración de la actividad enzimática

De manera habitual, la actividad enzimática se valoró empleando como sustrato butirato de *p*-nitrofenilo (*p*NPB, Sigma-Aldrich). La reacción se realizó a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 y sustrato a 1,5 mM de concentración. El *p*NPB se prepara previamente en acetona, quedando ésta en la reacción a una concentración del 7,5% (v/v). La hidrólisis del sustrato se siguió a 410 nm, en continuo, midiendo la liberación de *p*-nitrofenol ($\epsilon_{410\text{nm}} = 15.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160 A).

1 unidad internacional (U.I.) de actividad enzimática se definió como los μmoles de sustrato hidrolizados por minuto.

2.7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y ADN RECOMBINANTE

2.7.1. Vectores

La clonación de la secuencia madura de la esterasa en *P. pastoris* se realizó en dos pasos: un primer paso de clonaje en el vector pGEM®-T Easy (Promega) y un segundo paso de subclonaje en el vector pPIC9 (Invitrogen™). Las características de cada uno de ellos se detallan a continuación:

- **pGEM®-T Easy** (3,0 Kpb): vector de alto número de copias usado para la clonación directa de amplicones. Lleva incorporado el origen de replicación del plásmido pBR322 para su propagación en *E. coli* y el origen de replicación del fago filamentosos f1 para la obtención de ADN de hélice sencilla (ADNhs). Además, presenta la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ* α) que permite la identificación de las colonias transformadas gracias a un fenómeno de α -complementación. También se puede encontrar la región codificante de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (**figura 2.1**).

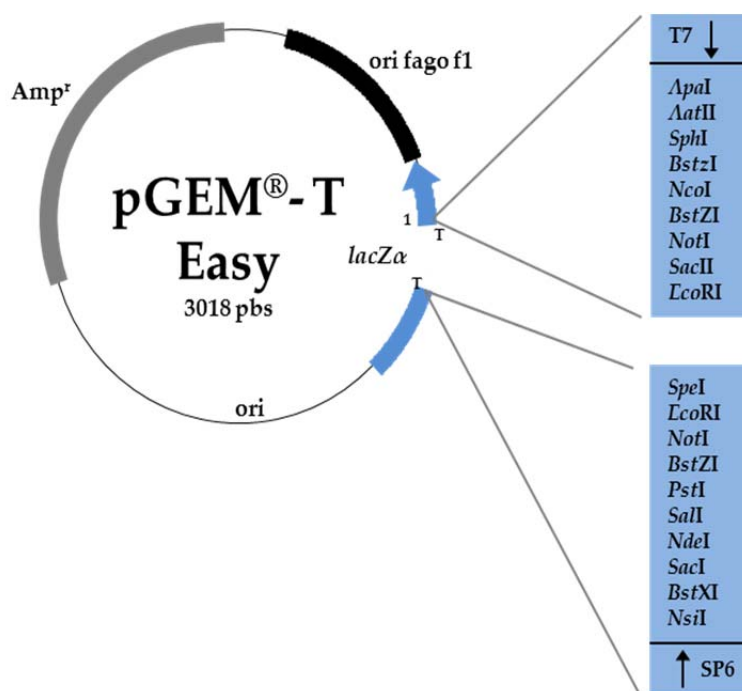


Figura 2.1. Mapa circular del vector pGEM®-T Easy. Se puede encontrar información más detallada en www.promega.com. Figura generada con el programa BioEdit v7.0.5.3.

- **pPIC9** (8.0 Kpb): vector de expresión extracelular en *P. pastoris*. Lleva incorporado el origen de replicación del plásmido pBR322 y el gen de resistencia a ampicilina para su propagación en *E. coli*. Se trata de un vector integrativo en el que la expresión del gen de interés es dirigida por el promotor de la alcohol oxidasa 1 (pAOX1). Este vector es portador de la secuencia señal de secreción del pre-pro péptido del Factor α de *S. cerevisiae* y del gen de la histidina deshidrogenasa (*his4*) para la selección de los transformantes (figura 2.2).

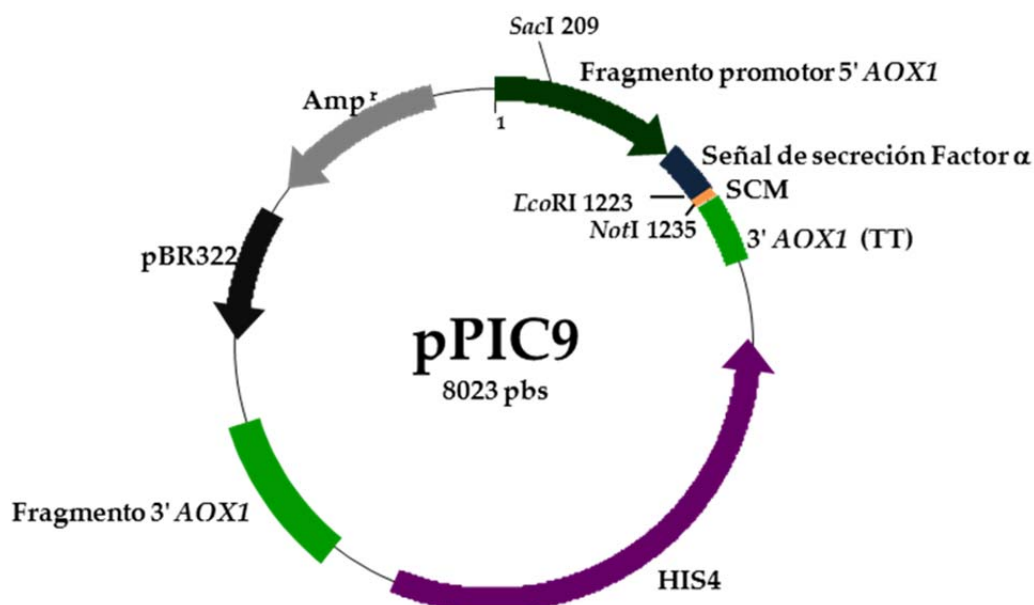


Figura 2.2. Mapa circular del vector pPIC9. Se indican las posiciones de los sitios de restricción empleados para este trabajo (información más detallada en www.invitrogen.com). Figura generada con el programa BioEdit v7.0.5.3.

2.7.2. Oligonucleótidos cebadores

Las secuencias de ADN empleadas como cebadores a lo largo de este trabajo para la amplificación y/o secuenciación de la región codificante para la proteína madura se muestran en la **tabla 2.21** junto a sus características.

-Materiales y métodos-

Tabla 2.21. Secuencias de oligonucleótidos cebadores

Cebador	Secuencia 5'→ 3'	mer	Mw	T _m (°C)	%GC
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTCACAAGC	21	6430,1	63,4	47,6
3' AOX1	CCAAATGGCATTCTGACATCC	21	6390,1	66,4	47,6
FPE	GG AATTCACAACCGTGAATGTAAACTACCC	30	9167,9	62,6	43,3
RPE	ATT TGCGGCCGCTTAGATGCGGAAGATGCCAATG	34	10522,6	67,8	52,9
IFPE	CTACGACCACGTTGTCAGCG	20	6077,9	66,8	60,0
IRPE	CTTGGTGTAGTCAACAGTGCG	21	6477,1	63,3	52,4
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18	5537,5	42,6	33,3
pT7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	6124,9	50,8	40,0

En los oligonucleótidos cebadores FPE y RPE se resaltan en negrita las dianas *EcoRI* y *NotI*, respectivamente. En ambos, los valores de temperatura de fusión (T_m) mostrados son sólo para la zona de hibridación. En rojo se indican bases adicionales para favorecer la acción de la enzima de restricción en caso de que se realicen digestiones con dianas justo en el extremo final de la secuencia del amplicón. Los datos aportados para cada secuencia se obtuvieron con la herramienta *DNA calculator* (<http://www.Sigma-Aldrich-genosys.com/calc/DNAcalc.asp>). SP6: secuencia del promotor del fago SP6, pT7: secuencia del promotor del fago T7.

2.7.3. Extracción de ADN genómico de *O. piceae*

Se partió de cultivos crecidos durante 3 días en medio basal. Las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación 30 min a 10.000 rpm a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se lavaron con agua Milli-Q y se volvieron a centrifugar durante 30 min en las mismas condiciones, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron (liofilizador Telstar). El liofilizado se homogeneizó con una varilla de vidrio estéril hasta obtener un polvo fino que se resuspendió en 1 volumen de tampón HSE equivalente al peso del líofilo. Tras esto, se añadió 0,1 volúmenes de SDS al 10% (p/v) y se incubó 15 min a 65 °C, después se añadió 1 volumen de tampón TEA y se llevaron a cabo sucesivas extracciones con un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), hasta obtener una fase acuosa limpia. La última extracción se realizó añadiendo un volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Una vez recuperada la fase acuosa, se añadieron 0,2 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol, respecto del volumen recuperado, y se agitó suavemente para homogeneizar la mezcla. Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó 10 min a 5.000 rpm, 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó en las mismas condiciones y se secó a vacío para eliminar las trazas del alcohol. Ya seco, se resuspendió en tampón TEB y se incubó 30 min a 37 °C con 5 µg de ARNasa A (ribonucleasa A pancreática, resuspendida en NaCl 15 mM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y hervida 15 min para eliminar la actividad desoxirribonucleasa). Transcurrido este tiempo, el ADN se precipitó añadiendo 0,2 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó 5 min a 5.000 rpm y 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se secó al vacío. Ya seco se resuspendió en agua Milli-Q libre de ADNasas y se determinó su concentración espectrofotométricamente

2.7.4. Purificación de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos se acometió utilizando los kits *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) y *Qiagen midipreps kit* (Qiagen) para purificaciones a pequeña y mediana escala, respectivamente. Ambos métodos se basan en una lisis alcalina de las células seguida de la precipitación de ADN genómico y aislamiento del ADN plasmídico mediante la unión y posterior elución de éste a una resina.

2.7.5. Amplificación de ADN

La secuencia madura de la esterasa se amplificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empleando los cebadores FPE y RPE (**tabla 2.21**) en reacciones de 50 µL y empleando la enzima AmpliTaq® ADN polimerasa (Applied Biosystems) según las **tablas 2.22 y 2.23**.

Tabla 2.22. Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia madura de la esterasa

Componente	Volumen (µL)	Concentración final durante la PCR
H ₂ O Milli-Q	37,5	
Tampón 10X	5	1X
MgCl ₂ 25 mM	3	1500 µM
Mezcla de nucleótidos (conteniendo 10 mM de cada dNTP)	1	200 µM de cada dNTP
Cebador FPE 20 µM	1	0,4 µM
Cebador RPE 20 µM	1	0,4 µM
AmpliTaQ® ADN polimerasa, 5 U/µL	0,5	0,05 U/µL
ADN genómico <i>O. piceae</i>	1	~0,1 µg/reacción
Volumen total (µL)	50	

-Materiales y métodos-

dNTPs (Promega) cada uno a una concentración de 100 mM
MgCl₂ 25 mM (1,5 mL) (Roche-Applied Biosystems)
Tampón de PCR 10X II sin MgCl₂ 1,5 mL (Roche-Applied Biosystems)
AmpliTa^q ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* expresada en *E. coli* (Applied Biosystems), 1.000 unidades con buffer II. 5 Unidades/ μ L.

La comprobación de los transformantes de *E. coli* se hizo mediante la detección en ellos de la secuencia de la esterasa por amplificación, empleando los cebadores FPE y RPE y preparando las mezclas de PCR según la tabla anterior pero sustituyendo el volumen de ADN molde por agua y resuspendiendo en la mezcla cada una de las colonias seleccionadas. El programa del termociclador empleado se expone en la **tabla 2.23**.

Tabla 2.23. Programa del termociclador para la amplificación de la secuencia codificante de la región madura de la esterasa

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	
Desnaturalización	94 °C	45 s	30 X
Anillamiento/Hibridación	55 °C	45 s	
Extensión	72 °C	2 min 30 s	
Extensión final	72 °C	7 min	

2.7.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para las digestiones de ADN se emplearon enzimas de restricción de *New England BioLabs* siguiendo las indicaciones recomendadas para cada una de ellas en cuanto al tipo de tampón, presencia de BSA, temperatura, concentración y tiempo de incubación. En general, las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 30 μ L.

2.7.7. Desfosforilación de moléculas de ADN

Los plásmidos digeridos se desfosforilaron en sus extremos 5' para evitar religaciones en etapas posteriores. La desfosforilación se efectuó con fosfatasa intestinal de cordero (CIP, *Calf Intestine Phosphatase*) con el buffer suministrado junto a la enzima y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Roche).

2.7.8. Ligación de moléculas de ADN

Para las reacciones de ligación entre ADN plasmídico desfosforilado e insertos se utilizó la ADN ligasa del fago T4 (Promega). Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'P y 3'-OH de las moléculas de ADN. Las reacciones se dispusieron siguiendo las indicaciones del fabricante (*pGEM®-T Easy kit*, Promega) empleando una relación molar plásmido:inserto de 1:3 e incubando a 4 °C o/n.

2.7.9. Electroforesis en geles de agarosa

Electroforesis analítica y preparativa para análisis y manipulación de ADN se realizaron en geles de agarosa de valor medio para electroendosmosis (CONDA-Pronadisa) al 0,8% (p/v) en tampón TAE 1X. Los geles se corrieron a 100 V durante 1 hora empleando cubetas y fuentes (modelo 200/2.0) de Bio-Rad. Las muestras se aplicaron en tampón de carga en proporción 5:1. Las bandas de ADN fueron visualizadas con luz UV empleando un equipo *Gel Doc* (Bio-Rad), porque el gel contenía bromuro de etidio (Fluka) (3 μ L

por cada 50 ml de gel). En los geles analíticos la concentración de ADN se calculó a partir de patrones de electroforesis (estándar VI de 0,15-2,1 Kpb y VII de 0,37-8 Kpb, Roche).

El tampón de carga estaba compuesto de glicerol al 50% (v/v), EDTA 50 mM, azul de bromofenol al 0,1% (p/v) y xilen cianol al 0,1% (p/v). La composición del tampón TAE 1X fue de Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5.

2.7.10. Cuantificación de ácidos nucleicos

El ADN se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos y electroforéticos. En el primero de los casos se obtuvo la concentración de ácido nucleico a partir de su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de A_{260} equivale a 50 $\mu\text{g/mL}$ o 20 $\mu\text{g/mL}$, según se trate de ADN de doble hélice o cebadores, respectivamente. En el caso de ADN se obtuvo también la A_{280} para comprobar su relación de pureza según la relación A_{260}/A_{280} de modo que si esta relación es de entre el 1,8-2 significa que carece de contaminantes. En el segundo caso, la concentración de ADN se halló empleando patrones de concentración conocida en geles analíticos de agarosa (apartado 2.7.9).

2.7.11. Construcción del vector de expresión en *P. pastoris*

La secuencia madura (sin péptido señal) de la esterasa de *O. piceae* (OPE) (1,6 kpb) fue amplificada por PCR empleando el equipo *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer), utilizando como molde el ADN genómico purificado del hongo, según lo explicado en el punto 2.7.3, y los cebadores FPE y RPE (tabla 2.21), permitiendo así incorporar las dianas de restricción *EcoRI* y *NotI* en las posiciones 5' y 3', respectivamente, de la secuencia de la enzima. La incorporación de estas dianas permitió su posterior clonación en el vector habilitado para su expresión heteróloga.

El producto de PCR obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio y la banda de interés se purificó desde el gel empleando el *GeneClean Kit* (Q-BIOgene). El producto de PCR "fresco" se clonó en el plásmido pGEM®-T *Easy* originando el vector de clonación pGEM®-T *Easy*-OPE con el que se transformó *E. coli* DH5 α , según se describirá en el apartado 2.7.13. Los clones positivos, que en principio incorporaban la secuencia de la enzima, se seleccionaron por α -complementación (ver 2.7.13). 5 de ellos fueron elegidos para comprobar la presencia del plásmido mediante purificación de éste por *minipreps* (apartado 2.7.4) y posterior análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Subsiguientemente, fueron secuenciados en el Servicio de secuenciación del CIB, empleando los cebadores SP6 y Promotor T7 para comprobar la integridad de la secuencia de la enzima.

Uno de los clones verificados fue manipulado para subclonar la secuencia madura de la esterasa en el vector de expresión pPIC9 de la siguiente manera: una vez purificados ambos vectores desde los respectivos clones de *E. coli* mediante *minipreps*, se co-digirieron con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Mientras que a partir del vector pGEM®-T *Easy*-OPE digerido se obtuvo la secuencia madura de la enzima pura de un gel de agarosa, según el procedimiento indicado anteriormente, el vector pPIC9 digerido fue purificado con el *GeneClean Kit* (Q-BIOgene) y desfosforilado según el apartado 2.7.7, para evitar su posterior recircularización durante la etapa de ligación. Se obtuvo así el vector pPIC9-OPE como producto mayoritario de la reacción.

De nuevo, *E. coli* DH5 α fue transformada con la mezcla de ligación obtenida pasada por el *GeneClean Kit*. Veinte de los transformantes crecidos y seleccionados en una placa de LB-Ampicilina fueron analizados mediante PCR de colonias usando los cebadores FPE y RPE para comprobar, que efectivamente, presentaban el plásmido con la secuencia de la enzima. Varios de los clones positivos fueron crecidos en LB-Amp para purificar el plásmido por *miniprep* y éste se mandó a secuenciar con las parejas de cebadores 5' AOX1 y 3' AOX1, e IFPE e IRPE para comprobar que la secuencia de la enzima se encontraba en fase con el pre-pro péptido del factor α de *S. cerevisiae*.

-Materiales y métodos-

Todas las manipulaciones de ADN se efectuaron atendiendo a procedimientos estándares de biología molecular (Sambrook y Russell, 2001). A lo largo de todo el proceso de obtención de la construcción de ADN recombinante de interés se prepararon gliceroleros de los clones positivos, según el apartado 2.3.1.

2.7.12. Secuenciación automática de ADN y análisis de secuencias

La comprobación de la integridad de la secuencia madura de la estirpe clonada en los plásmidos pGEM®-T *Easy* y pPIC9 para descartar cambios de bases se determinó mediante su secuenciación empleando tanto los cebadores universales directo y reverso del bacteriófago M13, como cebadores específicos diseñados a partir de la zona interna de la secuencia (IFPE e IRPE). La secuenciación se realizó empleando el kit *BigDye® terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystem), usando como calibrador el ADN del gen *hsp69* del kit *BigDye® terminator v3.1 Sequencing Standard*. Los productos de reacción se resolvieron en un secuenciador automático *DNA Analyzer 3730* (Applied Biosystem). Esta tarea fue desempeñada por el Servicio de Secuenciación de ADN del CIB.

Para el análisis de las secuencias de ADN se emplearon los programas:

- BioEdit v7.0.5.3 y Chromas v1.45 para la visualización y alineamiento de secuencias.
- CLUSTAL W, para el alineamiento y comparación de secuencias (EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute).

2.7.13. Transformación de *E. coli* y análisis de transformantes

Células competentes de *E. coli* fueron obtenidas por el *método del RbCl* (Sambrook y Russell, 2001). A partir de un cultivo *o/n* de *E. coli* se inoculó un matraz de medio Ψ *broth* y se siguió el crecimiento hasta una D.O.₆₀₀ de 0,5. Tras ello, el cultivo se centrifugó a 2.500 rpm, 15 min, 4 °C. El precipitado celular resultante se resuspendió cuidadosamente en 30 mL de TFB I frío y se incubó en hielo 1h. Finalmente, las células fueron centrifugadas en las mismas condiciones y el precipitado fue resuspendido en 4 mL de tampón TFB II frío por cada 100 mL de cultivo. Las células obtenidas se alicuotaron a razón de 200 μ L y se conservaron a -80 °C.

Las células competentes se transformaron mediante choque térmico según lo descrito por (Sambrook y Russell, 2001). En primer lugar se procedió a descongelar las alícuotas de células competentes en hielo, tras lo cual se añadió el ADN transformante (10 μ L) y se mezcló suavemente con las células dejando incubar 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo, las células se incubaron 90 segundos a 42 °C e, inmediatamente, se devolvieron al hielo durante 2 min (choque térmico). A continuación, las células se recuperaron añadiéndoles 800 μ L de LB e incubándolas 1 hora a 100 rpm y 37 °C. En último lugar, diferentes alícuotas de las células se cultivaron en las condiciones apropiadas, dependiendo del tipo de selección de colonias transformantes, a 37 °C *o/n*.

La selección de transformantes se llevó a cabo mediante α -complementación (Ullmann *et al.*, 1967), para el caso de las células transformadas con pGEM®-T *Easy*, y mediante PCR de colonias para el caso de las transformadas con pPIC9 y la construcción pPIC9-OPE. En el primer caso, las células transformadas se crecieron en placas de LB conteniendo ampicilina sobre las cuales se extendieron 7 μ L de IPTG a una concentración de 200 g/L, como inductor del gen de la β -galactosidasa, y 40 μ L de X-Gal a una concentración de 20 g/L (en *N-N'*-dimetilformamida), como sustrato cromogénico análogo al de dicha enzima (Davies y Jacob, 1968). Se descartaron las colonias de color azul a favor de las de color blanco por ser estas últimas portadoras del gen de interés. En el segundo caso, las células transformadas se inocularon en medio sólido LB con ampicilina y la selección se acometió según lo descrito en el apartado 2.7.5.

2.7.14. Transformación de *P. pastoris* y selección de transformantes

2.7.14.1. Preparación de *P. pastoris* para la producción de esferoplastos

A partir de una única colonia de *P. pastoris* (GS115 o KM71) se inocularon 10 mL de medio YPD y se incubó a 28 °C, 275 rpm, *o/n*. Tras ello, 10, 20 y 40 µL de este cultivo fueron empleados para inocular matraces de 250 mL con 100 mL de YPD que se mantuvieron a 28 °C, 275 rpm, *o/n*. Una vez incubados, se seleccionó aquel cultivo para cada una de las cepas con una D.O.₆₀₀ entre 0,2 y 0,3 y se centrifugó para obtener las células a 3.000 rpm de 5-10 min a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall® RC 5C plus (Thermo Scientific). El resto de cultivos se descartó. Las células centrifugadas se sometieron a los siguientes tratamientos para obtener esferoplastos (ver **tabla 2.20** para las soluciones empleadas):

Las células se lavaron, resuspendiéndolas en 20 mL de agua destilada mediante ligeros movimientos con la mano y se transfirieron a un tubo de centrífuga estéril de unos 50 mL y se centrifugaron a 3.500 rpm 5 min a temperatura ambiente. El sedimento celular resultante se lavó y resuspendió con 20 mL de una solución fresca de SED y se volvió a centrifugar a 3.500 rpm 5 min a temperatura ambiente. Descartado el sobrenadante, las células se lavaron y resuspendieron con 10 mL de sorbitol 1 M y se volvieron a centrifugar en las condiciones anteriores. A continuación, se resuspendieron mediante ligeros movimientos en 20 mL de solución STE, de los cuales 10 mL se emplearon para tratarlas con una solución 3 mg/mL de liticasa de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich), durante 20 min a 25 °C en un baño Julabo SW22. Estas condiciones se obtuvieron según el protocolo descrito por (Invitrogen™, 2002a), que básicamente consistió en tratar los 10 mL restantes de la suspensión celular en STE con la enzima a 25°C, sacando muestras de 200 µL a diferentes intervalos de tiempo para mezclarlas con 800 µL de SDS 5% (p/v) y medir su D.O.₈₀₀. El porcentaje de esferoplastos producidos se considera óptimo cuando es del 70% y se puede obtener con la expresión (**ecuación 2.1**):

$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - [(D.O._{800t} / D.O._{800to}) \cdot 100] \quad \text{Ecuación 2.1}$$

siendo D.O._{800t} la densidad óptica a cada tiempo de muestreo; y D.O._{800to} el valor de biomasa inicial.

Los esferoplastos fueron centrifugados a 2.500 rpm 10 min a temperatura ambiente y, una vez descartado el sobrenadante, se resuspendieron manualmente y con delicadeza en 10 mL de sorbitol 1 M y se centrifugaron en las mismas condiciones que en el paso anterior. Después de ello, se lavaron con 10 mL de la solución CaS y se centrifugó de igual manera. Finalmente, las células desprovistas de pared se resuspendieron con cuidado en 600 µL de CaS y esta solución se destinó para su transformación.

2.7.14.2. Transformación de esferoplastos de *P. pastoris* con ADN plasmídico

Aproximadamente 10 µg de plásmido recombinante y parental (control) obtenidos por *midiprep* (apartado 2.7.4) y linealizados con la enzima *SacI* fueron utilizados para transformar los esferoplastos. Para ello, los 600 µL de éstos en solución CaS se alicuotaron en tubos Falcon™ de 15 mL a razón de 100 µL/tubo y se incubó cada uno de ellos con 10 µg de plásmido (parental o recombinante) a temperatura ambiente durante 10 min; salvo dos de los tubos en los que no se añadió ADN plasmídico. En uno de estos sólo se añadió 900 µL de sorbitol 1 M, como control de viabilidad celular y se mantuvo a parte del proceso hasta el paso de plaqueo. El otro se utilizó como control negativo del proceso de transformación. Tras ello, a cada uno de los tubos con ADN plasmídico se les añadió 1 mL de una solución recién preparada de PEG 40% (v/v):CaT (1:1), se mezcló cuidadosamente y se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Después, las células se centrifugaron a 2.500 rpm a temperatura ambiente para eliminar el PEG/CaT. Las células transformadas se resuspendieron en 150 µL de medio SOS y se incubaron 20 min a temperatura ambiente tras los cuales se añadieron 850 µL de sorbitol 1 M.

De cada una de las soluciones obtenidas de células transformadas se tomaron diferentes volúmenes de 100 a 300 µL y se mezclaron cada vez con 10 mL de medio de cobertura RD atemperado a 45 °C (agar fundido). Sólo 100 µL del control negativo fueron empleados para este fin. Inmediatamente, las células se

-Materiales y métodos-

plaquearon sobre placas Petri con medio RDB y una vez gelificadas se incubaron invertidas a 28 °C durante 4-6 días hasta la aparición de los transformantes, a excepción de las placas inoculadas con el control negativo en las que no se debían observar colonias. En paralelo, 100 µL de la solución de esferoplastos, aprovechada como control de viabilidad celular, se mezclaron con 10 mL de medio de cobertura RDH, atemperado también a 45 °C, y se plaquearon sobre placas con medio RDHB permitiendo su solidificación e incubándolas invertidas a 28 °C durante 4-6 días. La aparición de colonias en las placas indicó que las células conservaron su viabilidad tras el tratamiento con liticasa.

2.7.14.3. Selección de transformantes His⁺Mut⁺ e His⁺Mut^s

El medio RDB permitió seleccionar y aislar transformantes His⁺ (transformados con el plásmido parental o recombinante transfiriéndoles la auxotrofía para histidina). En el caso de la cepa GS115 varias colonias de estos transformantes se crecieron en placas de los medios MM y directamente desde éste en medio MD mediante un procedimiento de réplica en placa, consistente en utilizar el mismo inóculo de cada colonia seleccionada en RDB para sembrar ambos medios y en ese preciso orden, lo que resulta de vital importancia para comprobar su fenotipo: Mut⁺ o Mut^s. Mientras que las colonias con fenotipo Mut⁺ crecen en ambos medios, las Mut^s no crecen, o crecen muy poco, en presencia de metanol y exhiben un crecimiento normal en el medio con glucosa como única fuente de carbono, permitiendo así su diferenciación. Respecto a la cepa KM71, no fue necesario realizar una selección de transformantes en medio MM y MD pues la cepa presenta una disrupción del gen *aox1*, por lo que, la integración del plásmido linealizado en el genoma de la levadura genera solamente transformantes Mut^s. Desde las placas de RDB las diferentes colonias seleccionadas se crecieron en MD para comprobar su pureza y proceder a su mantenimiento.

Diferentes transformantes His⁺Mut⁺ e His⁺Mut^s fueron seleccionados y mantenidos apropiadamente para su uso a corto o largo plazo (apartado 2.3.2). Con ellos se formalizaron estudios de expresión en los medios de cultivo detallados en el apartado 2.2.3.3 en las condiciones previamente descritas (apartado 2.4.3) y se seleccionó al mejor de cada fenotipo.

La **figura 2.3** esquematiza todo el proceso de obtención del vector de expresión pPIC9-OPE y los pasos seguidos hasta la transformación de *P. pastoris* con él.

En el sitio web de la revista *Journal of Visualized Experiments* (JoVE) se puede visualizar un video en el que se resume y ejemplifica un protocolo de trabajo con *P. pastoris* (Weidner *et al.*, 2010) aunque con algunas diferencias al seguido en este trabajo.

-Esterasa versátil-

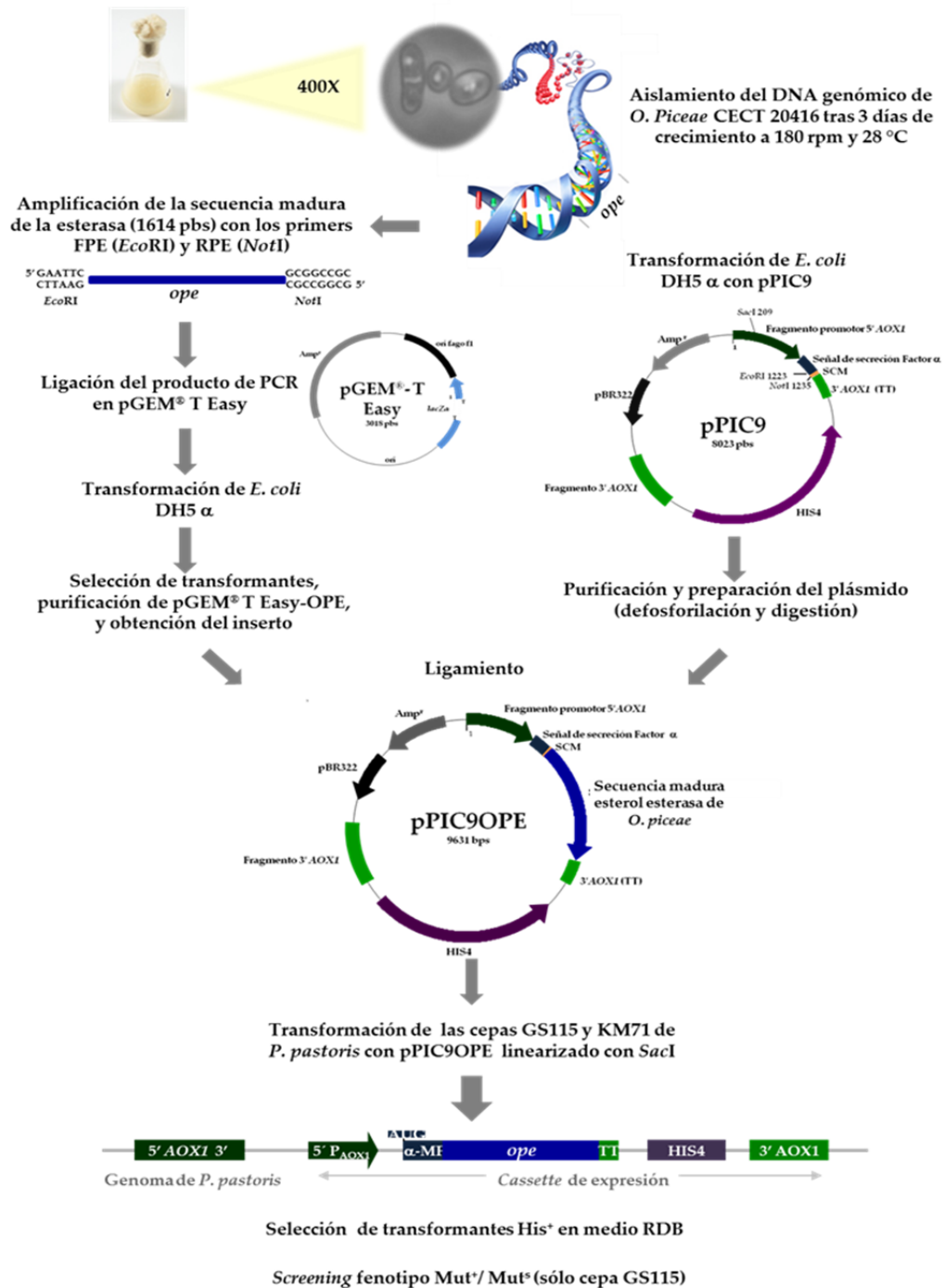


Figura 2.3. Esquematzación del proceso de clonación de la secuencia madura de la esterase de *O. piceae* y su expresión en *P. pastoris*.

2.8. CONCENTRACIÓN DE LAS ENZIMAS NATIVA Y RECOMBINANTE DE *O. PICEAE*

2.8.1. Ultrafiltración tangencial

Una vez que los cultivos alcanzaron el día de máxima actividad fueron centrifugados a 13.000 rpm, 4 °C durante 30 min en una centrífuga Sorvall® RC 5C Plus (Thermo Scientific). Tras ello, el crudo enzimático obtenido primero se filtró, a través de papel de filtro y membranas de nitrocelulosa de 0,8 µm (Millipore) en el caso de la enzima nativa y de 0,45-0,8 µm (Whatman) para la recombinante. Los crudos filtrados se

-Materiales y métodos-

concentraron en frío mediante ultrafiltración empleando distintos dispositivos según el volumen de líquido:

- Sistemas de ultrafiltración tangencial Pellicon™-2 *Miniholder* y Filtron, ambos de Millipore, acoplados a una bomba peristáltica MasterFlex®: estos equipos se emplearon para la concentración de volúmenes de crudo superiores a 0,5 L con membranas (Millipore) de 5 y 10 kDa de peso molecular nominal límite (PMNL), respectivamente. Permitieron concentrar los crudos a volúmenes inferiores de 300 mL.
- Sistema de ultrafiltración tangencial *Labscale* TFF acoplado a Pellicon® XL de 10 kDa de PMNL (Millipore) y sistema de ultrafiltración Amicon® 8200/8050 (Millipore) con membrana de celulosa regenerada de 3 kDa de PMNL (Millipore) acoplado a una bala de nitrógeno como generador de presión: con estos equipos los crudos se concentraron desde unos 300 mL a alrededor de 10 mL.
- Cartuchos de concentración por centrifugación Amicon® Ultra-4 mL (Millipore) y Nanosep® (Pall): el primero de ellos permite concentrar volúmenes de crudo de 4 mL a 50 µL, mientras que el segundo es válido desde 600 µL de muestra para su concentración a volúmenes inferiores de 50 µL. En ambos casos, una vez aplicadas las muestras, los cartuchos se centrifugan a 4 °C y 7.500 rpm y se concentran hasta el volumen deseado.

2.8.2. Liofilización de las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae*

Parte de los crudos obtenidos concentrados por ultrafiltración y conservados a -80 °C fueron sometidos a un proceso de liofilización durante 48 horas empleando un equipo Telstar. Los liófilos obtenidos fueron homogenizados y conservados a 4 °C.

2.8.3. Coliofilización de la enzima recombinante de *O. piceae* expresada en *P. pastoris* con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos caracterizados por presentar una estructura cilíndrica cónica anfipática constituida por unidades de glucopiranosas. En este estudio se emplearon los tres tipos principales de ciclodextrinas producidas industrialmente con el fin de favorecer la solubilidad de los sustratos ensayados (esteroles vegetales): α -CD (Sigma-Aldrich) formada por 6 unidades de glucopiranosas, β -CD (Sigma-Aldrich) constituida por 7 de tales unidades y γ -CD (Wacker) que cuenta con 8 (**figura 2.4**). Además, todas ellas presentan una serie de características diferenciadoras, entre otras su solubilidad y el volumen de la cavidad interna (**tabla 2.24**) (Szejtli, 1998).

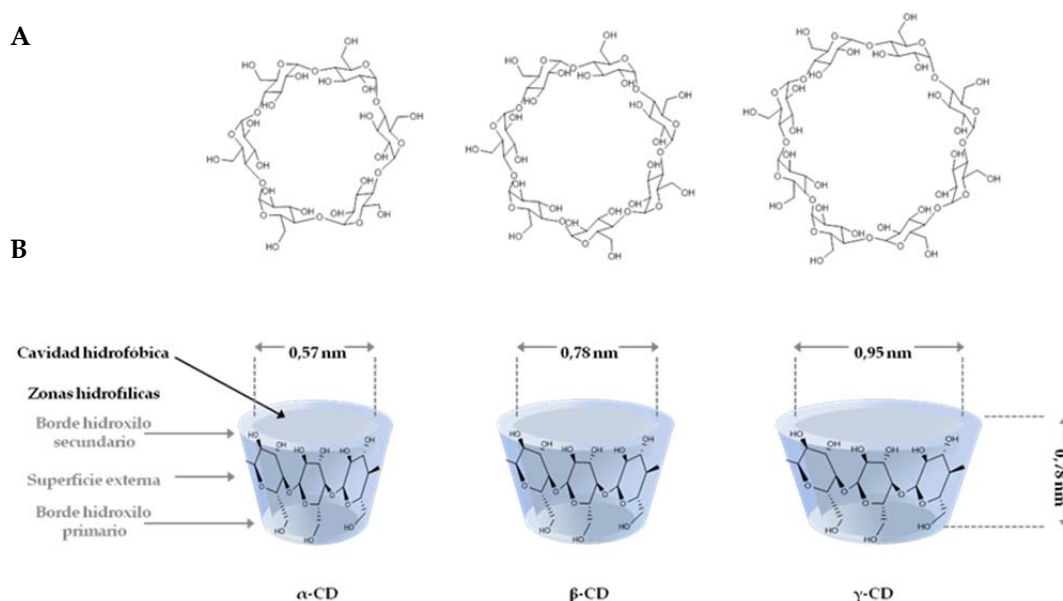


Figura 2.4. Ciclodextrinas. A) Estructura molecular de las ciclodextrinas usadas en este estudio donde se pueden apreciar las unidades de glucopiranosas que constituyen la supramolécula cíclica. B) Representación esquemática de la estructura cilindro cónica y de la naturaleza anfipática de estos oligoéteres en la que se indican las dimensiones geométricas aproximadas de la cavidad hidrofóbica. Adaptado de Szejtli, 1998.

Tabla 2.24. Características de α -, β - y γ -CDs (Szejtli, 1998)

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades glucosa	6	7	8
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	972	1135	1297
Solubilidad ($\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}\text{ H}_2\text{O}$, T ^a ambiente)	14,5	1,85	23,2
Volumen aproximado cavidad hidrofóbica (\AA^3)	174	262	427
Formas cristalinas (en H_2O)	Placas hexagonales	Paralelogramos monoclínicos	Prismas cuadráticos

Para la coliofilización se realizaron mezclas de crudo (liofilizado) y ciclodextrina en proporciones 1:1, 1:2 y 1:6 (en peso) en el interior de tubos FalconTM de 15 mL sobre los que se añadieron 4 mL de agua destilada para su disolución. Después, las mezclas fueron liofilizadas durante 48 h y los líofilos obtenidos se conservaron a 4 °C.

2.9. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

2.9.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La enzima recombinante se purificó en un único paso cromatográfico empleando un cartucho de octil-seferosa FF (GE Healthcare) acoplado a un equipo *Äkta purifier* (GE Healthcare) para purificación por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) compuesto de los siguientes módulos: inyector manual, sistema binario de bombeo P-900 con detector de presión y visualizador de flujo y porcentaje del solvente B, detector UV-Vis UV-900 con visualizador de dos longitudes de onda, conductímetro con visualizador de temperatura y colector de fracciones Frac-900. El programa UNICORN (GE Healthcare) permitió monitorizar y controlar el proceso de purificación y un posterior análisis de los cromatogramas.

En cualquiera de los casos, la muestra, previamente equilibrada en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M, se aplicó a la columna también equilibrada en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 en presencia de la sal y sólo tras un gradiente decreciente de esta y tras aplicar Triton X-100 reducido al 0,2% (v/v) se eluyó la proteína. La purificación se desarrolló a temperatura ambiente aunque las fracciones fueron depositadas sobre hielo rápidamente.

2.9.1.1. Eliminación del Triton X-100 forma reducida

Una vez purificada la proteína, el detergente se eliminó mediante ultrafiltración tangencial empleando un equipo PelliconTM-2 *Mini-Holder* (Millipore) con una membrana de 5 kDa de PMNL y una bomba peristáltica (Masterflex). Para ello, la proteína se diluyó con tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,0 por debajo de la concentración micelar crítica del tensioactivo [$\text{CMC} = 0,015\text{-}0,021\%$ (v/v)]. El proceso se desarrolló a 4 °C.

2.9.2. Cromatografía de fase reversa

Para ver el grado de contaminación de la proteína por péptidos fue necesario un paso más de purificación, tanto de la enzima nativa como de la recombinante, mediante cromatografía de fase reversa, empleando una columna C4 (Vydac Protein C4 214TP, 0,46x15 cm, tamaño de partícula 5 µm, Vydac) y un equipo HPLC Äkta purifier (GE Healthcare).

20 µg de proteína se diluyeron a la mitad en acetonitrilo al 20% (v/v) con ácido trifluoroacético al 0,2% (v/v). La separación se efectuó, tras equilibrar la columna, utilizando un gradiente lineal de 10 a 100% de acetonitrilo con trifluoroacético al 0,1%. El gradiente se realizó en 60 min, a un flujo de 1,0 mL/min y temperatura ambiente y la absorbancia se registró a 280 (proteínas) y 214 nm (péptidos).

2.10. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.10.1. Obtención del peso molecular

2.10.1.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) y tinción de proteínas.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó según Laemmli (Laemmli, 1970), empleando un sistema discontinuo de geles y un equipo Miniprotean III de Bio-Rad. La separación de las enzimas se hizo en geles de separación (carrera) al 7,5% (p/v) y de concentración al 4% (p/v); la composición de cada uno de los geles se especifica en la siguiente tabla:

Tabla 2.25. Composición geles de acrilamida SDS-PAGE

Componente (mL)	Gel de carrera (7,5%)	Gel concentrador (4%)
Agua Milli-Q	2,4	1,45
Solución A	1,25	0,33
Solución B	1,25	
Solución C		0,625
SDS 10% (p/v)	0,05	0,025
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,025	0,0125
TEMED 100%	0,005	0,005

Solución A: acrilamida/bisacrilamida 30%, 29:1, Bio-Rad

Solución B: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

Solución C: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

TEMED : N,N,N',N'-tetrametilatilendiamina

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

Las muestras a analizar se desnaturalizaron 5 min a 100 °C, en condiciones reductoras en tampón de carga, antes de su aplicación en los pocillos. La proporción de muestra: tampón de carga fue de 4:1. *High Molecular Weight Standard* y *Low Molecular Weight Standard* (Bio-Rad) fueron utilizados como patrones de peso molecular y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante, a una concentración de 0.1 µg/µL en tampón de carga. Éste fue preparado siguiendo las instrucciones de Bio-Rad pero empleando el doble de concentración de SDS y β-mercaptoetanol, para evitar el estado de agregación de la esterasa: Tris-HCl 0.06M, pH 6,8; glicerol al 9,2% (v/v); SDS al 4% (p/v); azul de bromofenol al 0,005% (p/v) y β-mercaptoetanol al 10% (v/v) (éste se añadió justo antes de usar en la proporción 1:19 respecto del volumen del resto de los componentes del tampón).

-Esterasa versátil-

La electroforesis se desarrolló en tampón Tris-base 25 mM, glicina 192 mM; pH 8,3-8,6, en presencia de SDS al 0,1% (p/v), a un voltaje de 50 V durante la etapa de concentración y de 100 V durante la de separación.

Una vez transcurrida la electroforesis los geles se tiñeron utilizando Coomassie R-250 o mediante tinción de plata, según la concentración de proteína cargada en el gel. La primera permite detectar concentraciones de 0,3 a 1 µg de proteína/banda, mientras que la segunda, permite la detección de 5-10 ng/banda.

Para la tinción con Coomassie R-250, los geles se cubrieron durante 30 min con una solución acuosa del colorante al 0,1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Tras ello, los geles se destiñeron con una solución metanol: ácido acético: agua Milli-Q (30:10:60).

En cuanto a la tinción con plata se siguieron los siguientes pasos (Switzer , III *et al.*, 1979):

Fijación

- El gel se sumergió en una solución de etanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 min y después, en una solución de etanol al 5% (v/v) y ácido acético al 1% (v/v) durante 15 min.

Lavado

- Se lavó 3 veces con agua destilada 1 minuto cada vez.

Sensibilización

- El gel se incubó en una solución de tiosulfato sódico al 0,2% (p/v) durante 1 minuto.

Lavado

- Se lavó 3 veces con agua destilada 30 segundos cada vez.

Tinción

- El gel se incubó en una solución de nitrato de plata al 0,1% (p/v) durante 15 min a 4 °C y en oscuridad.

Revelado

- El gel se incubó en una solución de carbonato potásico al 10% (p/v) durante 5 min y finalmente, en una solución de carbonato potásico al 2% (p/v) y formaldehído al 0,01% (v/v), hasta la aparición de las bandas.

Fijación

- Se sumergió en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 10%.

2.10.1.2. Densitometría de geles 1-D

Una vez teñidos, los geles se analizaron empleando un equipo GS-800™calibrado (Bio-Rad) controlado por el paquete informático *Quantity One*® 4.6 (Bio-Rad). La masa molecular, la cantidad relativa de cada una de las bandas de un carril o la cuantificación precisa de las muestras fueron obtenidos de esta manera.

2.10.1.3. Determinación de la masa molecular de la proteína por MALDI-TOF

Para determinar la masa molecular de la proteína mediante espectrometría de masas se procedió a mezclar 1 µL de una solución de proteína pura en agua (10 µg) con el mismo volumen de una solución saturada de la matriz (ácido sinapínico en ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v), en acetonitrilo:agua 1:3). 1 µL de la mezcla se depositó en un placa portamuestras MALDI de acero inoxidable (MTP384 *polished Steel*, Bruker-

-Materiales y métodos-

Daltonics) y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. La muestra se analizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker-Daltonics) controlado mediante el paquete informático *flexControl* (Bruker-Daltonics) y operado en modo positivo. Los espectros fueron adquiridos en modo lineal, usando una potencia de láser justo por encima del potencial de ionización. Alrededor de 1.000 disparos de láser fueron sumados en un único espectro de masas. Los espectros se analizaron con el programa *flexAnalysis* (Bruker-Daltonics). Previamente al análisis se realizó una calibración externa del instrumento en el rango de m/z comprendido entre 20-70 kDa, utilizando el kit *Protein Calibration II* (Bruker-Daltonics).

2.10.2. Desglicosilación

Mediante desglicosilación con Endo- β -N-acetilglucosaminidasa (EndoH) (Roche) las cadenas de carbohidratos unidos a la proteína por enlaces N-glicosídicos fueron eliminadas. Esta enzima hidroliza el enlace glicosídico entre los dos restos de N-acetilglucosamina del *core* sacarídico, dejando uno de ellos unido a la asparagina y liberando el resto de la cadena glucídica.

En primer lugar, la esterasa se desnaturalizó en presencia de SDS al 0,06% (p/v) y β -mercaptoetanol 0,1 mM, en tampón acetato 50 mM, pH 5,5 a 100 °C, 5 min. Después se enfrió en hielo, se añadieron 25 mU de EndoH y se incubó a 37 °C durante 16 horas.

2.10.3. Isoelectroenfoque

El punto isoelectrico (pI) de la proteína se determinó utilizando una cubeta horizontal Bio-Rad (*Model 1405 Electrophoresis Cell*) refrigerada por agua. Se prepararon geles de poliacrilamida al 5% (p/v) y 0,15 cm de espesor, según el método descrito por Görg (Görg *et al.*, 1980). La composición del gel se detalla en la **tabla 2.26**.

Las muestras de enzima se aplicaron directamente sobre pocillos excavados en el gel de 0,5x0,5 cm. Los electrodos de platino se colocaron sobre tiras de papel Whatman 3MM, humedecidas con H_3PO_4 1 M (ánodo) y NaOH 1 N (cátodo). El potencial y la intensidad de corriente se generó con una fuente Bio-Rad *Power Pac 3000* y la separación se programó partiendo de 1.000 V, 5 mA y 5 W, en un tiempo aproximado de 3 h. El gradiente de pH creado en el gel fue medido a intervalos de 1 cm desde el cátodo con un electrodo de contacto (Crison).

Tabla 2.26. Composición del gel de isoelectroenfoque

Componente	Volumen (mL)
Acrilamida 30% (p/v)	1,25
Anfolitos	0,375 intervalo pH 2,5-5,0 0,195 intervalo pH 3,0-10,0
Agua Milli-Q	5,64
Persulfato de amonio 10% (p/v)	0,0375
TEMED 100%	0,00375

Las bandas de proteína se revelaron tanto por tinción con azul coomassie como por actividad:

En el primer caso, los geles se lavaron durante 10 min en una solución de metanol, acético y agua (30:10:60) para evitar la interferencia de los anfolitos. Después fueron teñidos *o/n* con una solución filtrada de azul coomassie R-250 al 0,01% (p/v) en metanol:ácético:H₂O (40:10:60).

-Esterasa versátil-

El zimograma se hizo de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Lange *et al.* (Lange *et al.*, 2001), pero con algunas modificaciones. Finalizado el isoelectroenfoco, el gel se incubó en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, durante 10 min, para eliminar el efecto de los anfolitos y tamponar el pH. Para revelar la actividad, el gel se incubó en una mezcla 1:1 de soluciones A y B frescas (**tabla 2.27**) en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad (debido a la sensibilidad del butirato de α -naftilo) de 5-10 min, según la actividad de la muestra (generalmente se cargaron en torno a 25 mU), hasta la aparición de las bandas de color marrón (**figura 2.5**). Finalmente, éstas se fijaron empleando la solución de MeOH:acético:H₂O (40:10:60).

Tabla 2.27. Solución de revelado para el zimograma

Composición	
Solución A	butirato de α -naftilo (Sigma-Aldrich) 3 mM en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0. El sustrato se encontraba previamente a una concentración de 20 mM disuelto en acetona.
Solución B	25 mg de <i>Fast Garnet GBC</i> sal de sulfato (Sigma-Aldrich) disueltos en 25 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0.

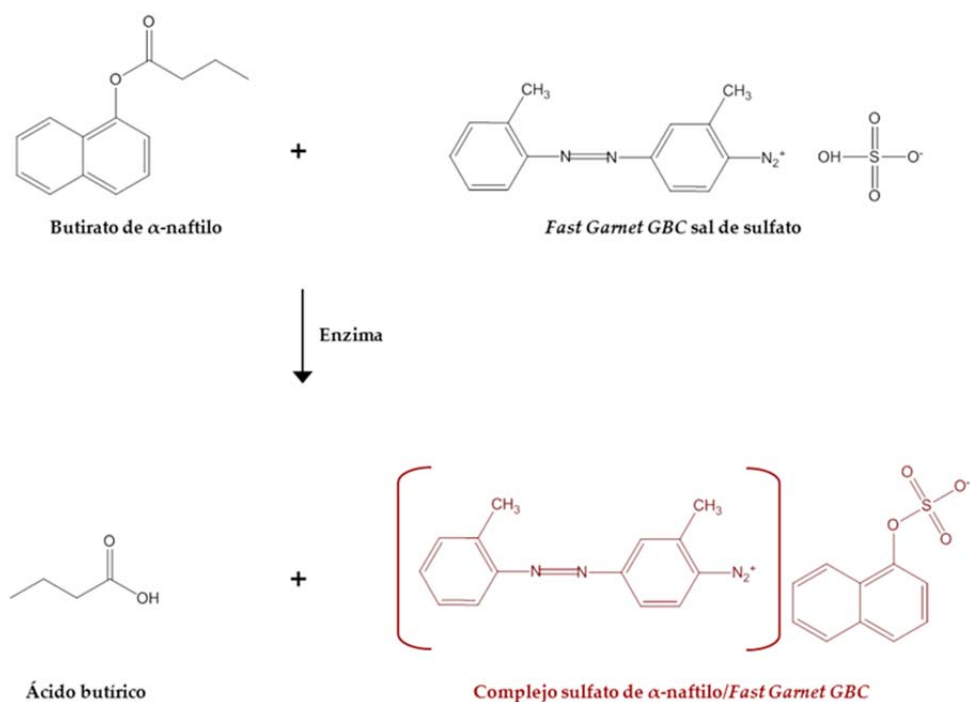


Figura 2.5. Reacción de hidrólisis del butirato de α -naftilo en presencia de *Fast Garnet GBC* para dar el complejo sulfato de α -naftilo/*Fast Garnet GBC* que origina un precipitado de color marrón.

El punto isoelectrico aproximado de la enzima se calculó por extrapolación sobre la recta de calibración obtenida (pH *vs* distancia en cm).

-Materiales y métodos-

2.10.4 Caracterización bioquímica de la enzima recombinante

2.10.4.1. pH óptimo y estabilidad vs pH

La influencia del pH en reacciones de hidrólisis se estudió empleando como sustrato *p*NPB a una concentración 1,5 mM y tampón CFB 20 mM, en un intervalo de pH de 2,0 a 12,0. Las reacciones se desarrollaron en continuo a temperatura ambiente.

Con respecto a la estabilidad al pH, la enzima fue diluida en tampón CFB 20 mM, en un intervalo de pH de 2,0 a 12,0 e incubada a temperatura ambiente durante 24 horas, valorando la actividad residual a diferentes tiempos.

La concentración de la enzima durante los ensayos fue de 1,6 y 3,2 µg/mL, respectivamente

2.10.4.2. Temperatura óptima y estabilidad vs temperatura

La influencia de la temperatura en la velocidad de catálisis de la enzima durante reacciones de hidrólisis se estudió utilizando *p*NPB a una concentración 1,5 mM y un intervalo de temperaturas comprendidas entre 5 y 90 °C. Las reacciones se desarrollaron en un espectrofotómetro Cary 4000 (Agilent Technologies), controlado a través del programa *Cary WinUV*.

Para el ensayo de termoestabilidad la enzima se diluyó en tampón CFB 20 mM, pH 6,0 y se incubó a 4, 30, 45 y 60 °C, durante 24 horas, valorando la actividad residual de la enzima a diferentes tiempos.

La concentración de la enzima durante los ensayos fue de 1,6 y 3,2 µg/mL, respectivamente.

2.10.4.3. Actividad en presencia de detergentes e iones

El efecto sobre la catálisis enzimática de algunos detergentes e iones se evaluó con *p*NPB a una concentración 1,5 mM, comparando la actividad residual de la enzima con la obtenida en ausencia de estos compuestos. Las reacciones se desarrollaron en continuo y a temperatura ambiente siendo la concentración de la enzima de 1,6 µg/mL.

Los detergentes evaluados fueron no iónicos, que se caracterizan por ser suaves y no afectar a la estructura ni a la actividad proteica. Se ensayaron: Tween®20 (Sigma-Aldrich), Tween®40 (Riedel-de Haën), Tween®60 (Sigma-Aldrich), Tween®80 (Sigma-Aldrich) y Triton X-100 forma reducida (Fluka), a concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 y 1,0% (v/v).

Los iones que se evaluaron fueron todos ellos cationes, los simples mercurio (Hg^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), potasio (K^+) y el poliatómico amonio (NH_4^+), procedentes de sus respectivas sales HgCl_2 (Merck), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), KCl (Merck) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) a concentraciones de 0,5, 1, 5 y 10 mM.

2.10.5. Caracterización cinética de la enzima recombinante en estado estacionario

Este trabajo se realizó en el grupo del Dr. F.J. Plou del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC.

Para la caracterización cinética de la enzima recombinante en estado estacionario se emplearon sustratos diferentes (**figura 2.6**), a concentraciones crecientes hasta la saturación de la enzima.

Para los ésteres de *p*-nitrofenol las medidas se efectuaron con agitación magnética, a 25 °C, en un espectrofotómetro Uvikon 941. Las reacciones se desarrollaron en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,0

-Esterasa versátil-

en presencia de NaCl 150 mM y Genapol X-100 al 1% (v/v), este último necesario para la solubilización de los sustratos.

Para los ésteres de glicerol y colesterol las medidas se realizaron por titulación, utilizando un pH-stato DL50 (Mettler Toledo) con NaOH 0,1 N como valorante (**figura 2.7**). Las reacciones se realizaron en tampón Tris-HCl 1 mM en presencia de NaCl 150 mM y Genapol X-100 al 5% (v/v), para la solubilización de los sustratos, a 25 °C y con una agitación relativa del 30%. El equipo se manejó a través del programa LabX 1.0.

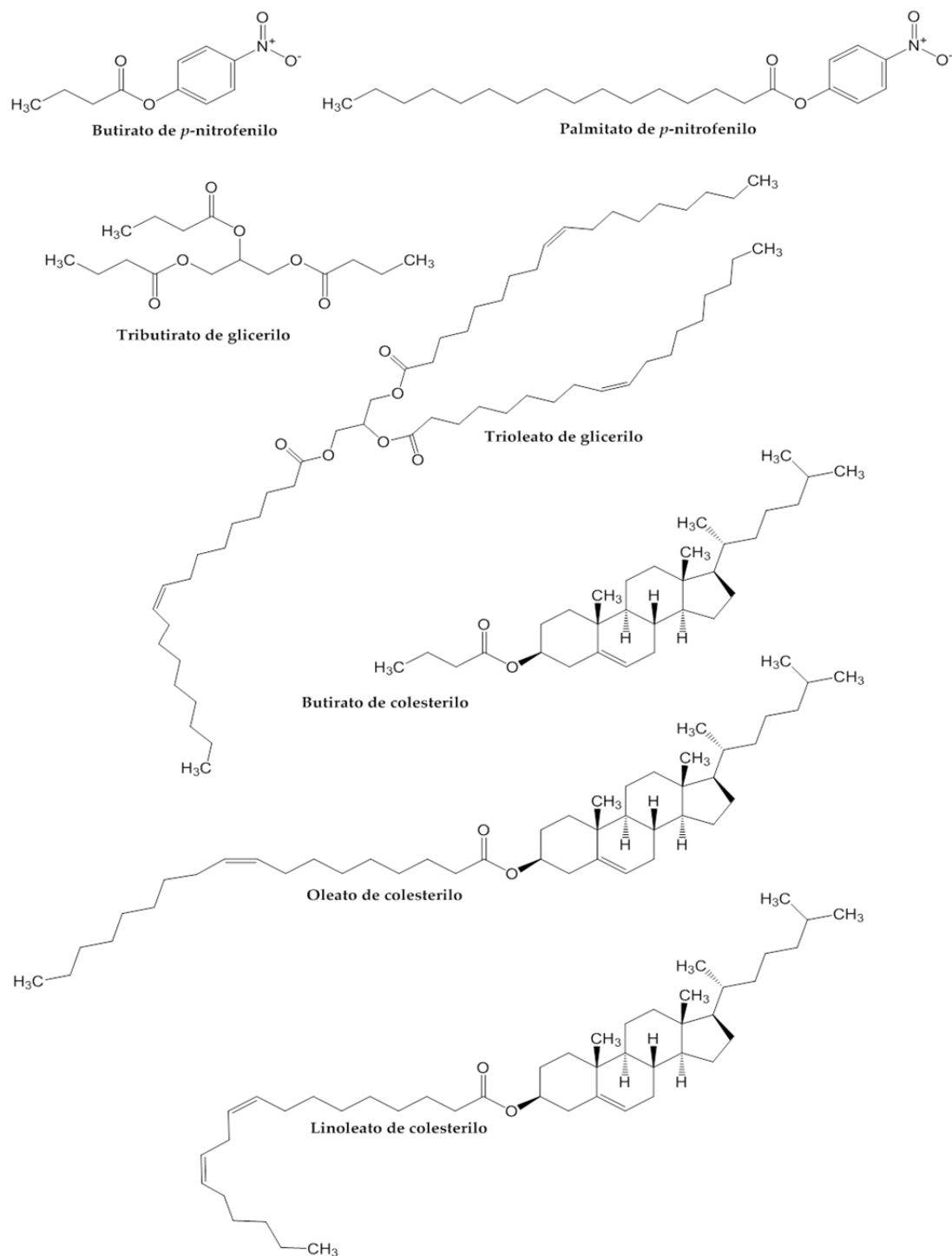


Figura 2.6. Fórmulas estructurales de los sustratos empleados para la caracterización cinética de la enzima recombinante. Se muestran ésteres de *p*-nitrofenol, de glicerol y colesterol.

-Materiales y métodos-

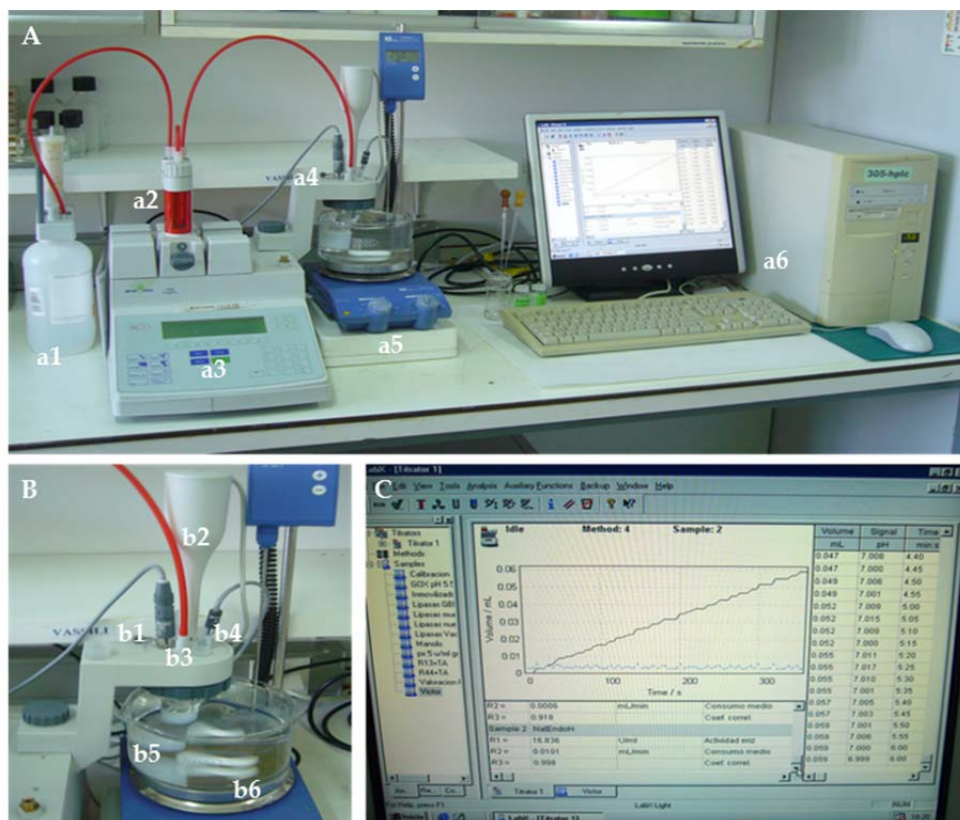


Figura 2.7. pH-stato DL50. A) Componentes del equipo: a1) NaOH 0.1 N, titulante, a2) bureta de dispensación de titulante, a3) unidad de control, a4) módulo de titulación, a5) baño termostatzado y a6) control remoto por ordenador. B) Módulo de titulación: b1) electrodo de pH de alta sensibilidad, b2) agitador, b3) vía de adición de NaOH 0,1 N, b4) sensor de temperatura, b5) cubeta de reacción y b6) baño termostatzado. C) Detalle de la pantalla de control remoto a través del programa LabX 1.0.

Para cada una de las reacciones ensayadas con los diferentes sustratos, el valor de actividad enzimática fue corregido con el valor de hidrólisis espontánea de aquellos en las condiciones de ensayo.

Una unidad de actividad enzimática (UI) se definió como los μ moles de *p*-nitrofenol o ácido graso liberados por minuto según el caso.

Los resultados obtenidos se ajustaron estadísticamente a una función hiperbólica (ecuación 2.2) correspondiente al modelo descrito por Michaelis-Menten con el programa SigmaPlot 11.0. Así se obtuvieron los valores de las constantes macroscópicas V_{max}^{ap} y K_m^{ap} . Mediante una modificación de la ecuación (ecuación 2.3) se pudieron obtener también los errores experimentales de otras constantes macroscópicas calculadas (k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}). Cada cinética se hizo al menos por triplicado y para la obtención de los valores de k_{cat}^{ap} y k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} se usó el peso molecular medio de la proteína recombinante glicosilada obtenida por MALDI-TOF (apartado 2.10.1.3).

$$V = \frac{V_{max}^{ap} \cdot [S]}{K_m^{ap} + [S]} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$V = \frac{k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} \cdot [S]}{1 + [S]/K_m^{ap}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

2.10.6. Estudio de modificaciones postraduccionales

2.10.6.1. Análisis de aminoácidos para la búsqueda de metioninas oxidadas

La composición de aminoácidos y la posible modificación en residuos de metionina en la proteína recombinante se determinó en un analizador Biochrom 30 (Biochrom) después de hidrolizar 10 µg de proteína pura nativa y recombinante con HCl 6 N a 110 °C durante 24 horas en vacío. Los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico y fueron derivatizados postcolumna con ninhidrina. Como patrón interno se empleó norleucina y como patrón de metionina oxidada se usó metionina sulfona (Sigma-Aldrich). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado por el Servicio de Química de Proteínas del CIB.

2.10.6.2. Análisis por MALDI-TOF/TOF

2.10.6.2.1. Digestión triptica en solución

El protocolo de digestión de la proteína que se utilizó para obtener los péptidos tripticos y realizar su búsqueda en las bases de datos fue el siguiente:

A 5 µg de proteína pura se le añadieron 3 µL de bicarbonato amónico 100 mM, pH 8,0. Después, se desnaturalizó a 60 °C 45 min, tras lo cual se añadió la tripsina a una concentración final de 16 ng/µL y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, la tripsina se inactivó añadiendo 2 µL de ácido trifluoroacético. La muestra se secó en *speed-vac* y se resuspendió en 10 µL de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). A continuación, se pasó a través de una punta de pipeta ZipTip C18 y se eluyó en 5 µL de acetonitrilo al 70% (v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). De esta solución se analizó 1 µL por MALDI-TOF/TOF.

2.10.6.2.2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

Para la obtención de la huella peptídica de la proteína 1 µL del digerido triptico fue mezclado con 1 µL de matriz [ácido α -ciano-4-hidroxicinámico a una concentración de 5 mg/mL en acetonitrilo al 33% (v/v) y ácido trifluoroacético al 0,25% (v/v)]. 1 µL de la mezcla se depositó en un portamuestras MALDI de tipo *Anchorchip 800 µm* (Bruker-Daltonics), que permite concentrar la muestra en una superficie hidrofílica muy pequeña, y se dejó secar a temperatura ambiente.

Los espectros de MALDI-MS y MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma automática en un espectrómetro de masas Autoflex III (Bruker-Daltonics), equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (Suckau *et al.*, 2003), detectando iones positivos en modo reflector, con un voltaje de aceleración iónica de 25 kV, un tiempo de retardo de 140 ns y acumulando entre 100 y 1.000 espectros individuales. Para el análisis de iones fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores son acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento, generados mediante descomposición inducida por láser del precursor, fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el programa *FlexAnalysis* (Bruker-Daltonics). Para obtener una mayor exactitud, los espectros MALDI-TOF se calibraron internamente empleando como referencia las señales de masa de dos iones provenientes de la autohidrólisis de la tripsina con una relación masa/carga (m/z) de 842,410 y 2.211,105, lo que garantizó un error menor de 50 ppm en las masas peptídicas detectadas.

La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de las señales protonadas de los iones fragmento de una mezcla de péptidos que cubre el intervalo $m/z = 800-3.200$.

-Materiales y métodos-

Los datos de MALDI-MS y MS/MS se combinaron mediante el programa *Biotoools* (Bruker-Daltonics) eliminándose los valores de masas de contaminantes (tripsinas, queratinas, matriz, aductos de sodio, etc.) y se lanzaron contra una base de datos no redundante [NR; $\approx 4 \times 10^6$ entradas, del Centro Nacional de Información en Biotecnología, Bethesda, EEUU (NCBI)], empleando el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science Londres, R.U.) (Perkins *et al.*, 1999). Otros parámetros de búsqueda fueron los siguientes: hidrólisis con tripsina, carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, tolerancia para péptidos 20 ppm y tolerancia para fragmentos MS/MS 0,5 Da. Las predicciones de proteínas con una puntuación mayor que 81 y $p < 0,05$ fueron consideradas significativas. Tanto los espectros de MALDI-MS y MALDI-MS/MS, como los resultados de la búsqueda en las bases de datos, fueron revisados manualmente en detalle utilizando los programas arriba mencionados.

2.10.6.2.3 Determinación de N-glicosilaciones por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

La determinación de los sitios de N-glicosilación se llevó a cabo mediante digestión con tripsina, en condiciones no reductoras, y posterior tratamiento con Endo H (aunque este tratamiento puede ser, igualmente, previo a la digestión triptica). El protocolo seguido se detalla a continuación:

A 5 μ g de la proteína se le añadieron 3 μ L de bicarbonato amónico 100 mM y se digirieron según el protocolo descrito (apartado 2.10.6.2.1). A la muestra tratada se le añadió 0,2 μ L de TFA al 10% (v/v) para disminuir el pH a 5-6 y se secó en *speed-vac*. Ya seca, se resuspendió en 5 μ L de tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,0 y se adicionó 1 μ L de Endo H para posteriormente incubarla a 37 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se calentó 5 min a 100 °C para inactivar la endoglicosidasa, se secó de nuevo en *speed-vac* y el sedimento resultante se resuspendió en 10 μ L de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). En último lugar, la muestra se pasó por una punta de pipeta ZipTip C18 para eliminar las sales y se eluyó en 5 μ L de acetonitrilo al 70% (v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). 1 μ L de ésta solución de péptidos desglucosilados se analizó por MALDI-TOF/TOF siguiendo el procedimiento ya descrito.

Los análisis descritos en este apartado 2.10.6.2 se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica del CIB.

2.10.7. Dicroísmo circular

El estudio de la estructura secundaria de las enzimas nativa y recombinante se llevó a cabo mediante análisis de dicroísmo circular, empleando un dicrógrafo Jasco J-720 y el programa *Spectra Manager*. La proteína, 0,1 mg/mL en 200 μ L de fosfato sódico 25 mM, pH 6,0, se depositó en cubetas de cuarzo (HELLMA), de 1 mm de paso óptico. Los espectros se registraron a temperatura ambiente entre 195-260 nm, a una velocidad de escaneo de 20 nm/min, una acumulación de 4 y un ancho de banda de 0,5.

Los datos obtenidos se examinaron mediante el algoritmo K2d (Andrade *et al.*, 1993) de la página DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (Whitmore y Wallace, 2004).

2.10.8. Determinación del N-terminal

El extremo amino terminal de la proteína recombinante se obtuvo mediante *degradación automatizada de Edman* de 10 μ g de muestra purificada usando el equipo Procise 494 (Applied Biosystems) por el Servicio de Química de Proteínas del CIB.

2.10.9. Ultracentrifugación analítica

Mediante esta técnica se pudo estudiar la velocidad y el equilibrio de sedimentación de las enzimas nativa y recombinante, obteniendo el coeficiente de sedimentación y una estimación de la masa molecular a partir de ambos tipos de estudios y; por ello, su estado de agregación.

Se empleó una ultracentrífuga XL-A de Beckman-Coulter Inc., equipada con un sistema óptico de detección UV-VIS y un rotor An50Ti. Las medidas de concentración proteica fueron hechas por absorbancia a 280 nm. Las muestras de proteína se encontraban a una concentración de en torno a 200 µg/mL en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,0 en ausencia y presencia de Genapol X-100 al 1% (v/v). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante los paquetes informáticos SEDFIT 11,8 y HeteroAnalysis 1,1,33 para la velocidad y el equilibrio, respectivamente.

Es importante tener en cuenta que la estimación de la masa molecular de la proteína se matizó aplicando la siguiente fórmula matemática que permite obtener la masa de flotación:

$$M_b = M_r (1 - p\bar{v}_p) + M_r (1 - p\bar{v}_D) \text{ Ecuación 2.4}$$

donde M_b es la masa de flotación; M_r la masa de la proteína; p es la densidad; \bar{v}_p es el volumen específico parcial de la proteína; y \bar{v}_D el volumen específico parcial del detergente.

2.11. ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA RECOMBINANTE

Este trabajo fue fruto de una estancia, en el marco de una beca FPU, en el grupo del Dr. F. Valero del Departamento de Ingeniería Química de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona.

2.11.1. Equipamiento empleado

2.11.1.1. Fermentadores

Para los procesos operados en discontinuo se empleó un fermentador Applikon® con un tanque de cultivo de 2 L de volumen operativo (**figura 2.8**). Para los procesos discontinuos alimentados se utilizó, por razones técnicas, un reactor modelo Biostat B (Braun Biotec, Melsungen, Alemania), con un tanque de 5 L de capacidad (**figura 2.9**). Ambos equipos constan de tres módulos: i) uno de cultivo formado por el tanque de cultivo, las sondas para la monitorización del proceso y el sistema de agitación, ii) la unidad de control digital (U.C.D.), para adquirir los datos de las sondas y donde se encuentran implementados los controladores de agitación, pO_2 , pH y temperatura y iii) un módulo de maniobra que incluye todo el sistema eléctrico, neumático e hidráulico para mantener constantes los parámetros de cultivo.

2.11.1.2. Analizador de metanol

Conocer y poder controlar la concentración de metanol durante los bioprocesos en discontinuo alimentado resulta de vital importancia para evitar su acumulación en niveles citotóxicos, especialmente cuando se trabaja con cepas de *P. pastoris* que emplean el pAOX1 para la producción de la proteína recombinante. Mediante el sensor de metanol modelo 2.1 de Raven (Raven Biotech Inc, Vancouver) se puede monitorizar en línea de una manera precisa la concentración de metanol presente en el medio de cultivo. El sistema sensor (**Figura 2.9D**) consta de un único módulo que permite el control y la monitorización del metanol a través de una sonda sumergida en el medio de cultivo. A ésta se le suministra un flujo constante de aire sintético, de modo que en presencia de metanol la conductividad de la sonda aumenta en función de la concentración de éste en el aire, lo que es reflejado en el analizador transformando la señal recibida en una medida de la concentración de metanol. A su vez, esta señal es recibida a tiempo real por el ordenador que mediante el algoritmo pertinente envía una acción determinada para la adición de metanol mediante microburetas.

-Materiales y métodos-

2.11.1.3. Sistema de adición automática de sustratos

En los bioprocesos en discontinuo alimentado fue necesario realizar adiciones pre-programadas de los sustratos con el fin de mantener una concentración de metanol cercana a la de consigna al trabajar con cualquiera de las cepas de *P. pastoris*, para facilitar la etapa de transición en el caso de la cepa Mut⁺ y mantener la velocidad de crecimiento constante (μ) durante la fase de inducción en el caso de la cepa Mut⁻. Para ello se dispuso de microburetas motorizadas (modelo microBUR 2031, Crison Instruments, España) controladas informáticamente para adicionar las cantidades adecuadas de cada uno de los sustratos según la estrategia programada con anterioridad (**Figuras 2.9B y 2.9E**).

2.11.1.4. Programas informáticos

En los bioprocesos en discontinuo realizados con el fermentador Applikon® los datos de las fermentaciones fueron recogidos mediante el programa *BioXpert Lite* proporcionado por el fabricante.

En el caso de los bioprocesos en discontinuo alimentado, todo el equipamiento empleado se encuentra monitorizado y controlado mediante un programa informático que permite recoger, en forma de tabla de datos, la información referente a cada cultivo. Este programa que implementa las diferentes estrategias reúne al *Visual Basic 6,0* y al programa de cálculo MATLAB 6,5,0,1,80913 a Release 13 (Ramón Real, 2007).

En la **figura 2.10** se recoge un esquema de todo el equipamiento empleado en los bioprocesos en discontinuo alimentado.

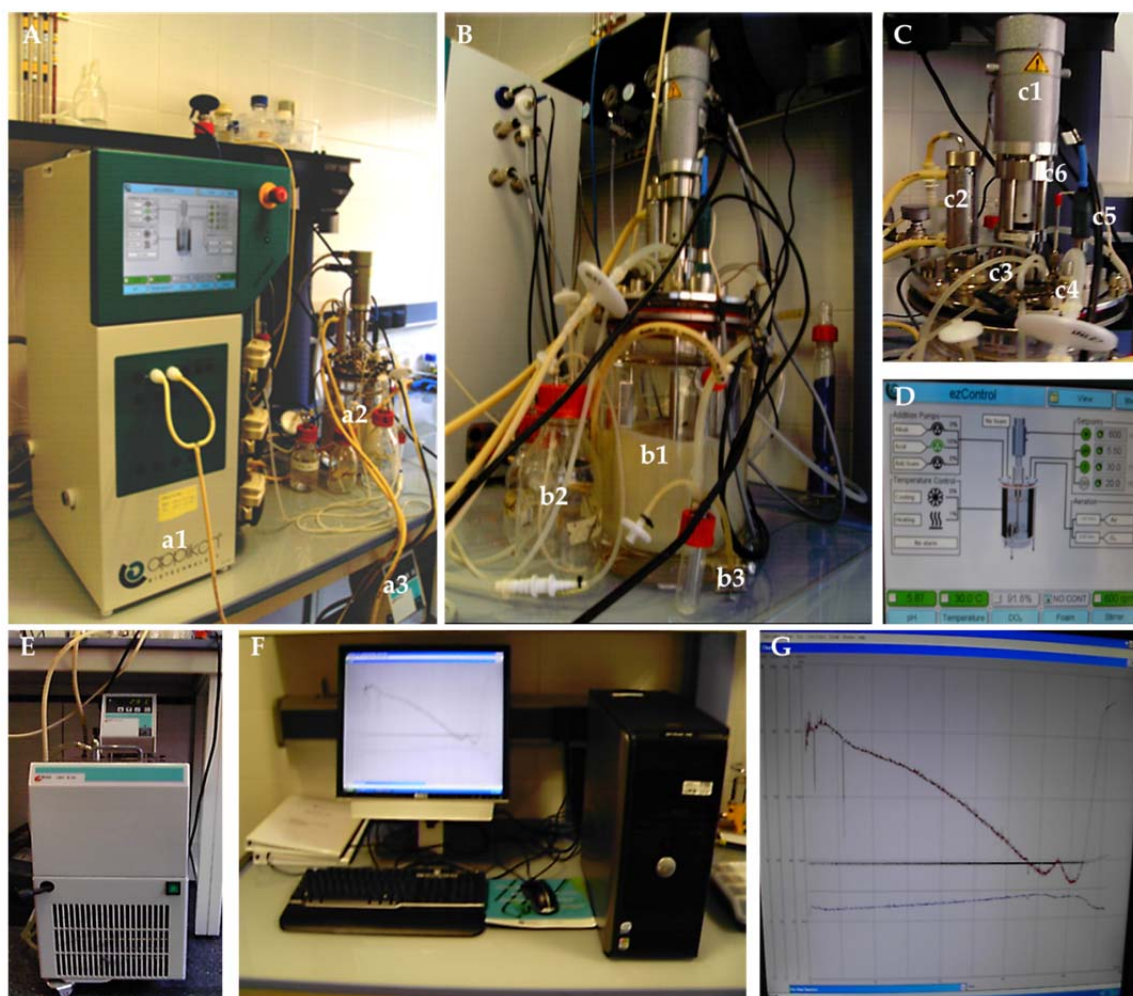


Figura 2.8. Fermentador Applikon® para bioprocesos en discontinuo. A) Vista general del equipo, a1) unidad de control digital (UCD), se aprecia la pantalla táctil y las bombas peristálticas de adición, a2) tanque de cultivo y a3) refrigerador. B) Tanque de cultivo: b1) cuba de cultivo de 2 L de capacidad, b2) frascos Pyrex® adición tampón, inóculo e YNB, b3) sistema de toma de muestra. C) Detalle del tanque de cultivo: c1) rotor hélices, c2) condensador (se ven la entrada y salida del sistema de refrigeración), c3) sistema de tres vías para la adición desde frascos Pyrex®, c4) entrada de aire estéril, c5) sonda de pH y c6) sonda de temperatura. D) Detalle de la pantalla de control táctil. E) Sistema de refrigeración del condensador. F) Monitorización del proceso por ordenador. G) Captura de pantalla del proceso de monitorización a través del programa *BioXpert Lite*.

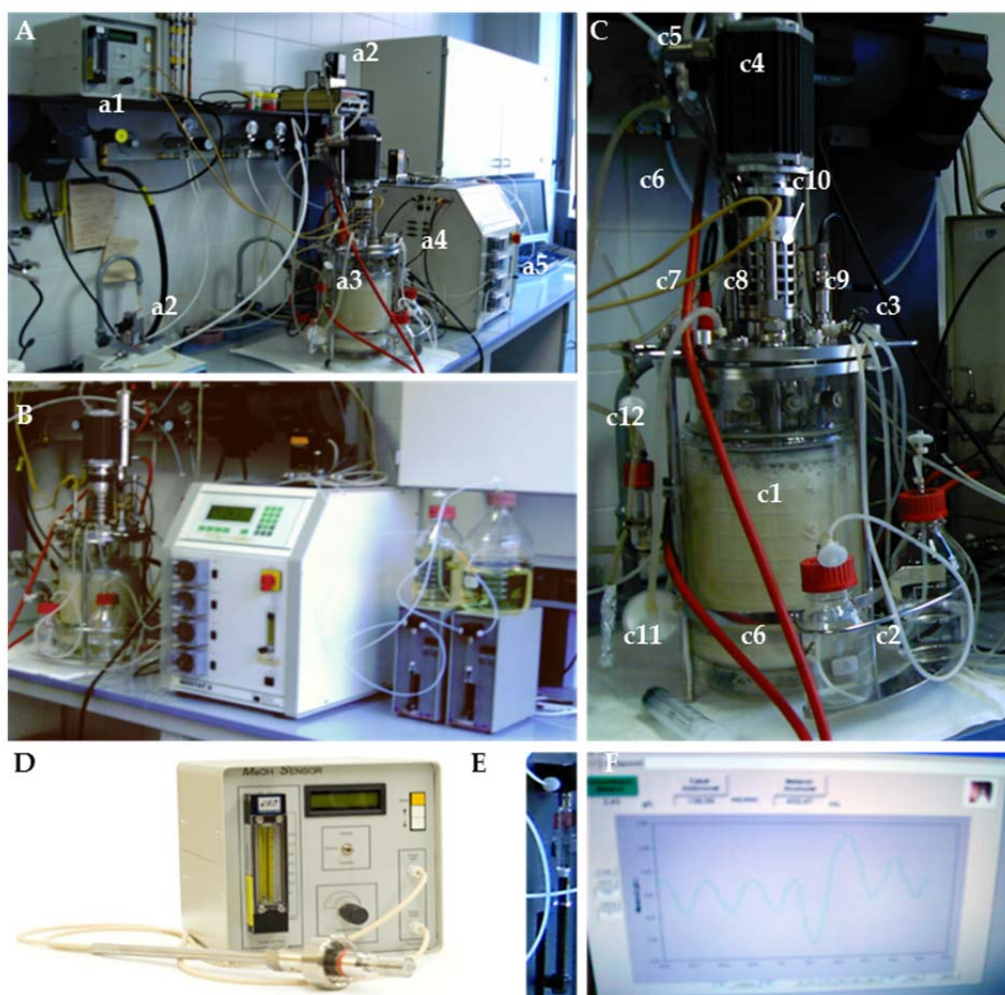


Figura 2.9. Fermentador Biostat B (Braun) adaptado para bioprocesos en discontinuo alimentado. A) Vista general del equipo: a1) sensor de metanol, a2) medidores de flujo másicos, a3) tanque de cultivo, a4) UCD, se aprecia la pantalla de información-control y las bombas peristálticas de adición, a5) monitorización por ordenador. B) Vista del equipo desde otra perspectiva para mostrar el sistema de adición automática de sustratos mediante microburetas microBUR 2031 (Crison). C) Detalle del tanque de cultivo: c1) cuba de cultivo de 5 L de capacidad, c2) frascos Pyrex® adición tampón e inóculo, c3) sistema de 3 vías para adición desde frascos Pyrex®, c4) motor del rotor de las hélices de agitación, c5) condensador (parcialmente tapado por el motor del rotor), c6) entrada y salida del sistema de refrigeración del condensador, c7) sonda de pH, c8) sonda metanol (se aprecian las conexiones de entrada y salida al detector), c9) sonda pO₂, c10) sensor de temperatura, c11) entrada de aire estéril y c12) sistema de toma de muestra. D) Detalle del analizador de metanol, se observan el detector conectado a la sonda. E) Detalle de las jeringas usadas con las microburetas de adición automática de sustratos. F) Captura de pantalla del proceso de monitorización a través del programa creado con Visual Basic 6,0 y MATLAB. Se puede apreciar la evolución de la concentración de metanol alrededor de la consigna marcada.

-Materiales y métodos-

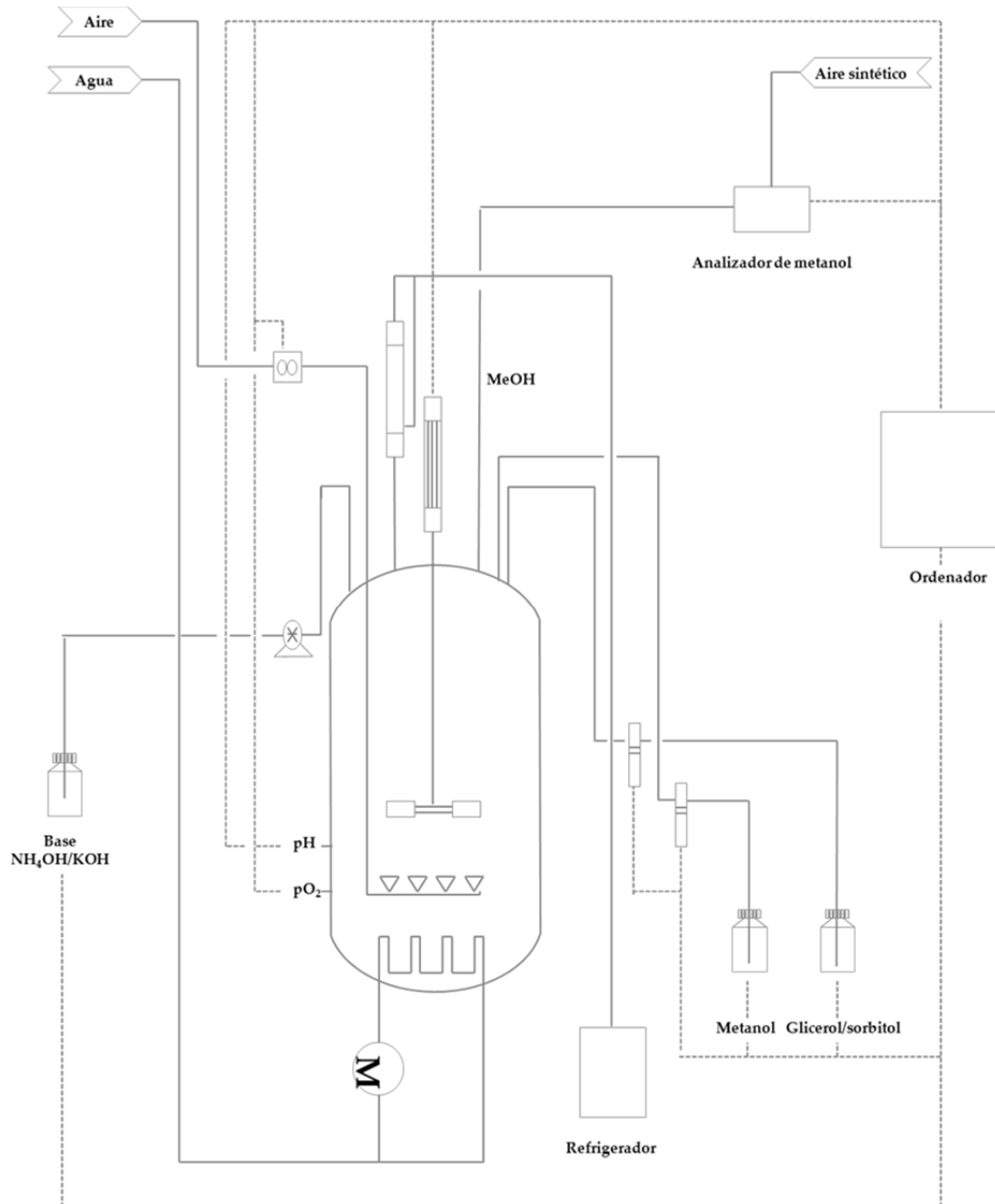


Figura 2.10. Esquema del equipamiento empleado para bioprocesos en discontinuo alimentado. En el caso de bioprocesos en discontinuo el esquema es válido pero eliminando el sistema de control de adición de sustratos y el analizador de metanol. En línea continua se enseñan las vías de entrada al fermentador, en línea discontinua se indican las vías de monitorización y control.

2.11.2. Preparación de los reactores para el desarrollo de bioprocesos con *P. pastoris*

En general, se siguieron las pautas reflejadas en los próximos apartados:

2.11.2.1 Pasos comunes en la preparación de un reactor para bioprocesos operando en discontinuo y discontinuo alimentado (primera fase)

Para cualquier tipo de bioproceso resultó necesario en primer lugar limpiar bien el tanque de cultivo y las palas y todas las vías de entrada y salida del fermentador, siendo esencial la limpieza del sistema difusor o de burbujeo de aire. Después, se dispusieron las entradas que irían conectadas a las bombas de adición (en este caso la de la base) y la entrada para el inóculo y el sistema de toma de muestra. Tras ello, se introdujo el medio de cultivo y se colocó la tapa del tanque de cultivo, asegurándose que la altura de las palas de agitación era la adecuada para el volumen de medio a inocular. Una vez hecho esto, se colocaron y conectaron la sonda de temperatura y la sonda de pH y ésta última se calibró usando tampones a pH 4,0 y 7,0 mediante el control digital de la unidad de control, que se mantuvo encendida desde este momento y hasta el término del cultivo. A continuación, se colocó la sonda de oxígeno, tras comprobar que el nivel del electrolito era el adecuado y que la membrana no estaba dañada. Antes de esterilizar, se cerraron todas las vías de entrada y salida con pinzas Hoffman, se cerraron todos los reservorios y se taparon con papel de plata los filtros y conexiones para evitar el contacto directo con el vapor de agua. El fermentador se cerró apretando los tornillos destinados a tal fin alternando en su enroscamiento. Para evitar la sobrepresión al autoclavar, de todas las salidas posibles se dejó una medio abierta al igual que todos los frascos con tapón a rosca y toma de muestra. Finalmente, se autoclavó a 121 °C durante 30 min y se sacó del autoclave cuando la presión bajó completamente y la temperatura estaba por debajo de los 50 °C.

Una vez esterilizado y justo en el momento de sacarlo del autoclave, se cerraron todos los frascos y el reservorio de la toma de muestra así como la salida que se dejó medio abierta. Ya ubicado en su lugar de funcionamiento, se abrió la salida de aire del fermentador, se conectaron al tanque las entradas de agua a la camisa para comenzar a refrigerar el fermentador a la temperatura de trabajo (30 °C) y se conectó la sonda de temperatura. Acto seguido, se conectó el condensador y se pusieron en marcha la agitación a las rpm de trabajo y la entrada de aire (desde un medidor de flujo másico en aquellos equipos que no dispongan de uno). En principio, es recomendable dejar el fermentador en estas condiciones durante 12 h para que se polarice la sonda de oxígeno.

Antes de inocular se tuvo que ajustar el pH del medio al pH de trabajo (5,5 en cualquiera de las situaciones estudiadas) con NH_4OH al 30% (v/v) o hidróxido potásico 5M (ver **tabla 2.18**). Se calibró la sonda de oxígeno (primero haciendo el cero con nitrógeno y después el 100% con aire comprimido) y se añadieron a través del septo los elementos del medio esterilizados por filtración (biotina 0,02% (p/v) a razón de 2mL/L y la solución PTM_1 a 5mL/L). Se inculó el reactor con el volumen de inóculo estimado para ajustar el volumen final de medio de cultivo (1,5 ó 3,2 L según el caso). En el caso de bioprocesos en discontinuo, se añadió también a través del septo el volumen necesario de metanol para la inducción y la expresión de la enzima. Por último, se conectó el programa informático de monitorización de los diferentes parámetros del cultivo (pH, pO_2 , rpm y temperatura) y se fueron obteniendo muestras a diferentes tiempos.

La pérdida de metanol por fenómenos de *stripping* se evitó conectando al condensador una unidad frigorífica y manteniéndolo a 4 °C.

-Materiales y métodos-

2.11.2.2. Pasos para la preparación del reactor Biostat B en bioprocesos de elevada densidad celular operando en discontinuo alimentado

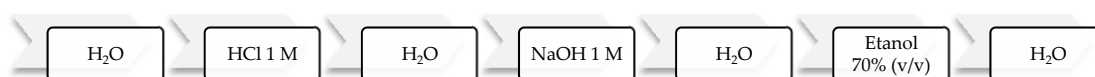
En el caso de los bioprocesos en discontinuo alimentado las etapas generales de puesta en funcionamiento del reactor fueron idénticas salvo por los siguientes aspectos:

La principal diferencia es que estos cultivos transcurren en tres fases como se comentó en la introducción: una primera fase de crecimiento en glicerol, una fase de transición y una última fase de inducción y producción. Para la fase de crecimiento en glicerol las especificaciones son las mismas que se comentaron en el punto anterior, pues esta primera fase no deja de ser más que un bioproceso en discontinuo. El desarrollo de las fases de transición e inducción es algo diferente según la cepa de *P. pastoris* empleada, aunque el instrumental empleado es común para este tipo de bioprocesos.

La concentración de metanol se monitorizó en línea, mediante una sonda inmersa en el medio de cultivo. Por tanto, antes de proceder a autoclavar el reactor se tuvo que instalar, junto con el resto de las sondas, éste sensor en el tanque de cultivo. Para que no se dañaran las conexiones y proteger la sonda durante la esterilización, éstas se envolvieron en gasa y papel de plata. Justo antes de comenzar la adición de metanol se encendieron el analizador y el programa informático específico para su monitorización.

Además, se tuvo que incorporar dos nuevas vías (microburetas) para la adición controlada de las fuentes de carbono que se suministran durante las fases de transición e inducción en el caso de la cepa Mut⁺ y solamente para la fase de inducción en el caso de la cepa Mut^s.

En cuanto a la cepa Mut⁺, fue durante la fase de crecimiento en glicerol cuando se tuvo que ir adaptando el instrumental detallado para el desarrollo de las otras dos fases. Por ello, se procedió a efectuar la esterilización química de las microburetas mediante 10 repeticiones del siguiente ciclo controlado por un programa informático para una adición continua de cada solución:



Una vez esterilizadas, se realizaron dos lavados con las soluciones a emplear, se conectaron a las vías de entrada al tanque del reactor preparadas para tal fin y se cebaron con las soluciones pertinentes: glicerol al 50% (v/v) y metanol puro, que fueron adicionadas durante la fase de transición siguiendo el programa mostrado en la **tabla 2.28**. Todo ello controlado mediante el paquete informático correspondiente.

Tabla 2.28. Programa de adición de sustratos en la fase de transición para bioprocesos en discontinuo alimentado con la cepa Mut⁺

Hora de transición	Flujo de adición de metanol (μL/min)	Flujo de adición de glicerol al 50% (v/v) (μL/min)
1 ^a	-	300
2 ^a	-	300
3 ^a	100	160
4 ^a	100	100
5 ^a	100	65

Durante la fase de transición fue necesario cambiar la base empleada para controlar el pH del medio de NH₄OH al 30% (v/v) a KOH 5M.

Tras ello, comenzó la fase de inducción empleando una solución de metanol puro, como única fuente de carbono, y NH_4Cl a una concentración de 107,5 g/L, como fuente de nitrógeno a la que se le añadió biotina 0,02% (p/v) a razón de 2 mL/L y la solución de sales traza a una concentración de 5 mL/L. La adición de metanol se hizo mediante una de las microburetas controlada por un programa informático desarrollado para mantener en el reactor la concentración de metanol lo más cercana posible a la consigna establecida.

Con la cepa Mut^s el bioproceso transcurrió, igualmente, en tres etapas pero con las siguientes diferencias: en primer lugar, hubo una fase de crecimiento en glicerol, seguida de una fase de transición en la que se emplearon como sustratos metanol (~20 mL de metanol para obtener una concentración de 5g/L) y sorbitol (32 g de sorbitol disueltos en 80 mL de agua destilada para una concentración de 10 g/L), estrategia de co-adición de diferentes sustratos, y se cambió la base de ajuste del pH, como se expuso previamente. Durante esta etapa se preparó todo el instrumental necesario para la fase final. Es decir, se procedió a la esterilización química de las microburetas, según la estrategia comentada con anterioridad, para adicionar las fuentes de carbono empleadas durante la fase de inducción que fueron sorbitol en un stock de 300 g/L, en presencia de NH_4Cl a 107,5 g/L, y metanol puro. A ambas soluciones se les tuvo que añadir antes de su utilización las soluciones de biotina y de sales traza. Mediante el programa informático adecuado se adicionaron cada una de estas fuentes de carbono a través de las microburetas.

Al igual que en el caso de los bioprocesos en discontinuo, en los bioprocesos a elevada densidad celular se evitó la pérdida de metanol por *stripping* mediante la refrigeración del condensador una vez que aquél fue añadido al interior del fermentador. También se monitorizaron los diferentes parámetros del cultivo (pH, pO_2 , rpm y temperatura) y se fueron obteniendo muestras a diferentes tiempos.

Como se mencionó, la adición a través de las microburetas de cada fuente de carbono está controlada por un programa informático característico. En concreto, la adición de metanol en bioprocesos en discontinuo alimentado durante la fase de inducción se pre-programó mediante un algoritmo de control predictivo acoplado a un controlador proporcional integral (PI) desarrollado por Cos *et al.* (Cos *et al.*, 2006a) con el fin de mantener una concentración de inductor constante en el reactor (**ecuación 2.5**) de 3 g/L para la cepa Mut⁺ y de 2,5 g/L para la Mut^s gracias a la señal recibida de la sonda de metanol acoplada al analizador de metanol.

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \underbrace{\frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt}}_{\text{Consumo}} + \underbrace{K_p \left[(\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \varepsilon_t \right]}_{\text{PI}} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

donde F (L/h) es el flujo de alimentación de metanol; M_0 (g/L) es la concentración de la solución de metanol que sirve para alimentar al biorreactor; M (g/L) es la concentración de metanol en el interior del biorreactor; V (L) es el volumen de medio en el interior del biorreactor; K_p (adimensional) es la ganancia del controlador proporcional; τ_i (adimensional) es el parámetro del efecto integral; y ε (adimensional) es la diferencia entre el valor de consigna y la concentración de metanol en el medio de cultivo.

El primer término de la ecuación describe la adición de la cantidad de metanol consumido por la levadura, mientras que el segundo introduce un control de retroalimentación para mantener la concentración de metanol estable alrededor del valor marcado (consigna). Este algoritmo permite así, fijar los parámetros de control, K_p y τ_i , a lo largo de los cultivos y amortiguar los cambios de consigna.

La adición de sorbitol durante la etapa de inducción en procesos en discontinuo alimentado con la cepa Mut^s se realizó mediante un algoritmo de control diseñado para llevar a cabo una adición exponencial pre-programada a una velocidad específica de crecimiento determinada (μ), menor que la velocidad

-Materiales y métodos-

máxima de crecimiento ($0,015 \text{ h}^{-1}$) estimada de un cultivo en discontinuo según las **ecuaciones 2.6 y 2.7** (Ramón *et al.*, 2007):

$$Ql_{t_0} = \frac{[\mu \cdot V \cdot X] \cdot 1.000}{60} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$Ql_{t_n} = Ql_{t_0} \cdot e^{\mu \cdot \Delta t} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde Ql_{t_0} ($\mu\text{L}/\text{min}$) es el flujo inicial de adición de sorbitol al comienzo de la fase de inducción; μ (h^{-1}) es la velocidad específica de crecimiento estimada; V (L) es el volumen de medio en el fermentador al inicio de la fase de inducción; X (g/L) es la biomasa presente en el fermentador al inicio de la fase de inducción; Ql_{t_n} ($\mu\text{L}/\text{min}$) es el flujo de adición de sorbitol a cada intervalo de 10 horas de la fase de inducción; y Δt (h) es el intervalo de tiempo transcurrido entre el flujo de adición de sorbitol a tiempo cero en la fase de inducción con respecto al tiempo en el que cambiará de nuevo el flujo para mantener la velocidad específica de crecimiento.

2.11.3. Condiciones de cultivo para bioprocesos con *P. pastoris*

2.11.3.1. Preparación del preinóculo

El preinóculo para el biorreactor se obtuvo de cultivos crecidos en Erlenmeyers bafleados de 1 L con 200 mL de medio YPD, a 30°C y 230 rpm durante 48 h inoculados con la levadura. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue centrifugado en una centrífuga J2-21 M/E (Beckman) 30 min, 4°C a 8.000 rpm y las células colectadas fueron resuspendidas en el volumen adecuado de agua destilada estéril y usadas para inocular el biorreactor Applikon® o el Biostat B según el caso.

2.11.3.2. Condiciones de cultivo en bioprocesos operando en discontinuo

En general, este tipo de bioprocesos se desarrollaron en un fermentador Applikon® con un tanque de 2 L de volumen operativo pero empleando un volumen de 1,5 L de medio YNB o Invitrogen™. En lo que respecta al uso del medio YNB, éste presentaba como fuente de carbono e inductor metanol para la cepa Mut⁺ y metanol junto con sorbitol para la cepa Mut^s. En cuanto al medio Invitrogen™, éste se usó desestimando el glicerol de su composición y añadiendo metanol y sorbitol a la concentración indicada (apartado 2.2.3.4)

Las fermentaciones se desarrollaron a 30°C , pH controlado a 5,5, 600 rpm de agitación y oxígeno disuelto por encima del 30% de saturación de aire manteniendo la aireación a 2 L/min para la cepa Mut⁺ y a 1 L/min para la Mut^s.

Las fermentaciones se dieron por finalizadas una vez consumidos los sustratos salvo en el caso de la cepa Mut⁺ en la que fue necesaria una segunda adición de metanol debido a su rápido metabolismo.

2.11.3.3. Condiciones de cultivo en bioprocesos de elevada densidad celular operando en discontinuo alimentado

Las células (Mut⁺ y Mut^s) se cultivaron en un biorreactor Braun Biostat B con un tanque de 5 L de capacidad, siendo las condiciones de cultivo las siguientes: un volumen inicial de medio de 3,2 L, agitación 900 rpm, 30°C de temperatura, pH controlado a 5,5 por la adición de NH_4OH al 30% (v/v) durante la fase de crecimiento en glicerol y KOH 5 M durante las fases de transición e inducción, oxígeno disuelto por encima del 30% de saturación de aire con un flujo de aire de entre 0,5 a 10 L/min y de oxígeno puro de 0,5 a 1 L/min según la fase del cultivo y la cepa. Fueron necesarias realizar estas mezclas para asegurar la viabilidad celular ya que el aporte de aire comprimido resultó insuficiente.

-Esterasa versátil-

Los procesos en discontinuo alimentado se dividieron en tres fases comunes para ambos tipos de cepa pero con diferencias en cuanto a su desarrollo como ya se comentó en el apartado 2.11.2.2.:

En el caso de la cepa Mut^r, el cultivo comenzó con una fase en discontinuo empleando glicerol como fuente de carbono a una concentración de 40 g/L, después de esto, una vez consumido el glicerol, se añadieron metanol y glicerol según la estrategia programada de adición mediante microburetas automáticas (**tabla 2.28**), de modo que, a lo largo de la fase de transición va disminuyendo la adición de glicerol mientras que la de metanol se mantiene constante. Finalmente, durante la fase de inducción y producción, la adición automática de metanol fue programada mediante el algoritmo de control descrito en la sección 2.11.2.2 para mantener una concentración constante de 3 g/L a partir de una solución de metanol puro conteniendo los micronutrientes de la solución PTM₁ y biotina. El metanol se analizó en línea a través del sensor implementado para tal fin.

En cuanto a la cepa Mut^s, el cultivo comenzó también con una fase en discontinuo empleando glicerol como fuente de carbono a la misma concentración (40 g/L). Consumida esta fuente de carbono comenzó la fase de transición en la que se añadieron sorbitol a una concentración de 10 g/L y metanol a una concentración de 5 g/L. Una vez agotados los sustratos de la fase de transición, comenzó la fase de inducción y producción, en la que se adicionó una solución de sorbitol a una concentración de 300 g/L con NH₄CL a 107,5 g/L, suplementada con la solución PTM₁ y biotina, siguiendo la estrategia de adición exponencial descrita (sección 2.11.2.2). Así mismo, la adición de metanol fue programada para mantener una concentración constante de 2,5 g/L según lo descrito en el párrafo anterior.

Las fermentaciones se dieron por llegadas a término cuando fue imposible mantener la viabilidad celular con concentraciones de oxígeno disuelto por debajo del 30% de saturación en el caso de la cepa Mut^r. Este hecho, junto con los elevados niveles de crecimiento con riesgo de lisis celular y proteólisis del producto recombinante, fue la causa para detener los bioprocesos con la cepa Mut^s.

El protocolo de cultivo en biorreactor de *P. pastoris* desarrollado por Tolner *et al.* (Tolner *et al.*, 2006), aunque con algunas diferencias respecto de lo explicado en esta sección, constituye una guía pormenorizada sobre los diferentes pasos a seguir para la puesta en marcha de un fermentador y su posterior descontaminación una vez acabada la producción.

En la **tabla 2.29** se resumen las diferentes estrategias de cultivo mostrando las fuentes de carbono y nitrógeno para cada caso y la base empleada para regular y mantener el pH al de trabajo.

-Materiales y métodos-

Tabla 2.29. Resumen de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas según el bioproceso y la base necesaria para mantener el pH

Tipo de bioproceso	Cepa	Medio	Fase	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Base control pH
Discontinuo	Mut ⁺	YNB	-	MeOH 10 g/L	Sales YNB (NH ₄) ₂ SO ₄	KOH 5M
	Mut ^s	YNB	-	MeOH 10 g/L Sorbitol 10 g/L	Sales YNB (NH ₄) ₂ SO ₄	KOH 5M
		MBS*	-	MeOH 10 g/L Sorbitol 10 g/L	NH ₄ OH 30% (v/v)	NH ₄ OH 30% (v/v)
Discontinuo alimentado	Mut ⁺	MBS	D	Glycerol 40 g/L	NH ₄ OH 30% (v/v)	NH ₄ OH 30% (v/v)
			T	Programación Glicerol-MeOH (Tabla 2.26)	NH ₄ OH 30% (v/v)	NH ₄ OH 30% (v/v)
						KOH 5M
			I	MeOH 3 g/L	NH ₄ Cl 107,5 g/L	KOH 5M
	Mut ^s	MBS	D	Glycerol 40 g/L	NH ₄ OH 30% (v/v)	NH ₄ OH 30% (v/v)
			T	MeOH 5 g/L Sorbitol 10 g/L	NH ₄ OH 30% (v/v)	NH ₄ OH 30% (v/v)
						KOH 5M
			I	MeOH 2,5 g/L Sorbitol limitante	NH ₄ Cl 107,5 g/L	KOH 5M

D: fase en discontinuo, T: fase de transición e I: fase de inducción, MeOH: metanol.

*MBS sin glicerol en su composición.

2.11.4. Métodos analíticos

2.11.4.1. Determinación de la biomasa total

La biomasa total (células viables y no viables) presente en el fermentador se obtuvo a partir de medidas de peso seco celular y de densidad óptica.

El peso seco se calculó mediante gravimetría a partir de muestras de 5 mL. Estas se centrifugaron, a 12.000 rpm 5 min, y el sedimento se resuspendió en 5 mL de solución isotónica (NaCl 0,9% p/v). Se repitió el lavado con la solución isotónica y el sedimento se resuspendió en 5 mL de agua destilada para después filtrarlo a través de un filtro de microfibra de vidrio (Whatman GF/F), tarado previamente. La biomasa retenida se lavó con 10 mL de agua destilada, se secó en una estufa a 100 °C, 24 h, y se depositó en un desecador con gel de sílice. La biomasa se calculó por diferencia entre el peso del filtro con la biomasa seca y el filtro sin ella.

La D.O.₆₀₀ de las muestras (longitud de onda de máxima dispersión del haz de luz por *P. pastoris*) se midió en un espectrofotómetro Cary-50 (Agilent Technologies).

Mediante una recta de calibrado se correlacionó la D.O.₆₀₀ frente al peso seco: las medidas espectrofotométricas se multiplicaron por un factor de 0,2 para obtener los g/L equivalentes.

2.11.4.2. Determinación de las concentraciones de glicerol, sorbitol y metanol

La concentración de glicerol, sorbitol y metanol se determinó *off line* mediante HPLC empleando un equipo HP 1050 liquid chromatograph (Agilent Technologies), dotado de inyector automático y una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Ácido sulfúrico 15 mM fue empleado como fase móvil y el volumen de inyección fue de 20 µL estableciéndose un tiempo de carrera de 30 min. La adquisición y tratamiento de datos se realizó con el paquete informático Millenium 2.15.10 (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). La desviación estándar residual (RSD) del método fue del 3%.

El metanol se analizó también *off line* mediante cromatografía de gases empleando un equipo HP serie 5890 (Agilent Technologies), equipado con un inyector automático (HP 7376), un detector de tipo FID (*Flame Ionization Detector*) y una columna capilar Tracsil TR-FFAP 25 m x 0,53 mm x 1 µm (Tracer-Teknokroma). Las condiciones de operación fueron 200 °C y 280 °C para el inyector y detector respectivamente, la temperatura del horno se mantuvo a 40 °C 2 min, una rampa de 20 °C/min hasta 200 °C, para después dejar 5 min en isotérmico a esta temperatura siendo el tiempo total de análisis de 15 min. El gas portador fue helio a un flujo de 9 mL/min y el gas generador fue hidrógeno. Como patrón interno se empleó isopropanol, a la concentración de 4 g/L, que se diluyó a la mitad con las muestras previamente filtradas por 0,45µm. La adquisición y tratamiento de datos se acometió con el paquete informático Millenium 32 (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). El RSD estimado fue del 2%.

2.11.5. Cálculos

2.11.5.1. Cálculo de los rendimientos

Los rendimientos son parámetros que permiten conocer la eficacia de conversión de una variable en otra. Se pueden calcular rendimientos parciales o rendimientos globales del bioproceso según si se calculan en un momento determinado de éste o se considera todo el proceso. No son parámetros constantes ya que pueden variar a lo largo del cultivo según las necesidades del microorganismo.

Los diferentes rendimientos y la forma de calcularlos se indican a continuación:

-Materiales y métodos-

▪ *Rendimiento biomasa/sustrato* ($Y_{X/S}$): se define como la cantidad de biomasa por unidad de sustrato consumida. Se puede calcular midiendo la cantidad de biomasa generada y sustrato consumido en un determinado periodo de tiempo:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{Ecuación. 2.8}$$

▪ *Rendimiento producto/biomasa* ($Y_{P/X}$): se define como la cantidad de producto generado por unidad de biomasa. La forma habitual de calcularlo es midiendo las cantidades de biomasa y de producto generados en un determinado intervalo de tiempo:

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

2.11.5.2. Cálculo de productividades

Se define productividad como la relación de producto obtenido con los factores para obtenerla en un determinado periodo de tiempo.

En el caso de bioprocesos se habla más concretamente de “productividad volumétrica” como la cantidad de producto formado por unidad de tiempo y volumen y “productividad específica” como la cantidad de producto formado por unidad de biomasa y tiempo.

Al igual que los rendimientos se pueden calcular de manera sencilla para un determinado momento del bioproceso o para el proceso global; siendo esta última la que proporciona más información.

$$\text{Productividad volumétrica} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

$$\text{Productividad específica} = \frac{\Delta P}{\Delta X \cdot \Delta t} \quad \text{Ecuación. 2.11}$$

siendo ΔP (U/L) el incremento de la productividad; Δt (h) el incremento de tiempo; y ΔX (g/L) el incremento de la concentración de biomasa.

2.12. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

2.12.1. Reacciones de hidrólisis del acetato de polivinilo (PVAc)

Las reacciones se realizaron en tubos Pyrex® de 10 mL. Muestras de 3 mL de PVAc, de 12.800 g/mol, se prepararon en metanol:agua (15:85%) (v/v) a concentraciones de 0,3 y 0,6% (p/v) y se trataron con 27 U (frente a *p*NPB) de enzima nativa y recombinante. Los tratamientos se realizaron a 28 °C y 100 rpm en un baño Julabo SW22 durante 48h. La reacción consiste en la desacetilación del polímero, dando lugar al alcohol polivinílico y ácido acético (**figura 2.11**).

-Esterasa versátil-

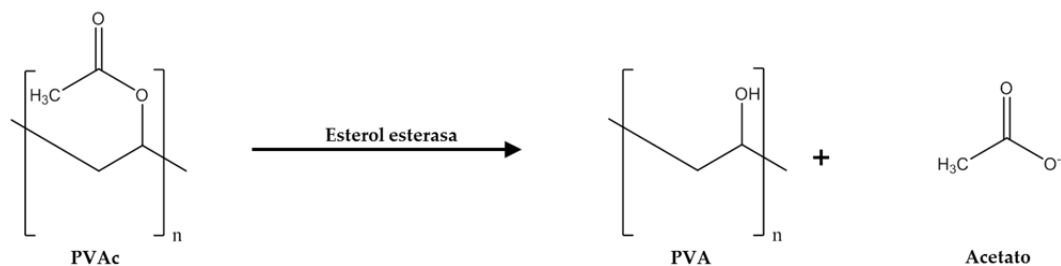


Figura 2.11. Hidrólisis enzimática de PVAc. Se exponen las fórmulas estructurales de las especies reactivas y del producto.

2.12.1.1. Análisis de la desacetilación mediante Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

Concluido el tratamiento, las muestras fueron congeladas, liofilizadas y preparadas para su análisis por FTIR. Se mezclaron en un mortero 1-3 mg de liófilo con 300 mg de KBr. La mezcla se depositó en un molde y se compactó aplicando presión hasta la formación de una pastilla que se analizó en un espectrómetro JASCO-4200 *type A*. Se acumularon un total de 50 interferogramas a una resolución de 1 cm⁻¹. Se utilizó alcohol polivinílico comercial (PVA) como referencia.

2.12.1.2. Análisis de la desacetilación mediante Espectrometría de masas MALDI-TOF

1 µL de muestra tratada y sin tratar de PVAc se mezcló con 1 µL de matriz [ácido 2,5-dihidroxibenzoico 10 mg/mL en etanol al 10% (v/v)]. 1 µL de la mezcla se depositó en una placa portamuestras MALDI de acero inoxidable, se dejó cristalizar a temperatura ambiente y se analizó en un espectrómetro de masas Autoflex III. La adquisición de los espectros se hizo con el paquete informático *flexControl* usando una potencia de láser justo por encima del umbral de ionización operando en el modo positivo y lineal. Generalmente se sumaron 1.000 disparos de láser en un único espectro de masas. Los espectros se analizaron con el programa *flexAnalysis*. La calibración externa se realizó con el *Peptide Calibration Standard II* de Bruker-Daltonics que cubre un intervalo de 1.000 a 4.000 Da y citocromo C para el intervalo de 3.000 a 14.000 Da.

2.12.1.3. Análisis del ácido liberado en reacciones en pH-stato

Las reacciones se realizaron en Tris-HCl 1 mM, pH 7,0 con NaCl 0,15 M, Genapol X-100 al 1% (v/v) y PVAc al 0,3% (v/v) de 12.800 g/mol a 25 °C con una agitación relativa del 40% durante un máximo de 20 horas y se analizaron en un pH-stato modelo DL50 (Mettler Toledo). El volumen final de reacción fue de 20 mL y el sustrato se encontraba previamente a una concentración del 2% (p/v) disperso en metanol.

Además de realizar las reacciones con las enzimas de *O. piceae* (nativa y recombinante), esta técnica se utilizó para comparar con tres preparados enzimáticos comerciales proporcionados por Buckman (**tabla 2.30**).

La adquisición de los datos se hizo mediante el programa LabX 1.0 y el análisis del ácido liberado empleando la **ecuación 2.12**:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = VSTAT \cdot C/m \quad \text{Ecuación 2.12}$$

donde *VSTAT* (mL/min) es el consumo medio de agente valorante (NaOH 0,1N); *C* (µmol/mL) = *c*·*t*·1.000 representa el factor de corrección de la concentración real del valorante; *c* es la concentración del valorante (0,1 N), *t* el título del agente valorante; y *m* (mL) el volumen de muestra (enzima).

-Materiales y métodos-

Tabla 2.30. Preparados enzimáticos comerciales empleados para la desacetilación de PVAc

Nombre y acrónimo	Actividad	Origen	Factoría heteróloga	Características
Buzyme® 2517 BZM2517	Lipasa	*Desconocido	<i>Aspergillus</i> sp.	Enzima pura procedente de cultivos sumergidos de una cepa de <i>Aspergillus</i> modificada genéticamente. Patentada para su aplicación en la industria papelera con el fin de disminuir los problemas ocasionados por extraíbles de la madera.
Buzyme® 2518 BZM2518	Lipasa	*Desconocido	<i>Aspergillus</i> sp.	Enzima pura procedente de cultivos sumergidos de una cepa de <i>Aspergillus</i> modificada genéticamente. Se trata de la misma enzima que BZM2517 pero en diferente formulación.
Optizyme® 530 Optz530	Esterasa	<i>Magnoportha grisea</i> (sinónimo <i>M. oryzae</i>) (Ryu <i>et al.</i> , 2008)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima pura procedente de cultivos sumergidos de una cepa de <i>Aspergillus oryzae</i> modificada genéticamente. Patentada para su aplicación en la industria papelera para el biocontrol de <i>stickies</i>

*No se ha encontrado información relativa al origen de estas enzimas y la casa comercial no proporcionó información al respecto.

2.12.2. Reacciones de síntesis

2.12.2.1. Síntesis de oleato de heptilo

La síntesis de oleato de heptilo se realizó para comprobar la capacidad de las enzimas nativa y recombinante de catalizar reacciones de síntesis de ésteres en medio orgánico (Cárdenas *et al.*, 2001) (figura 2.12).

La mezcla de reacción, preparada en tubos Pyrex® de 10 mL de capacidad con tapón a rosca con junta de teflón, se encontraba compuesta por ácido oleico 20 mM (Sigma-Aldrich), 1-heptanol 20 mM (Fluka), 3 mL de isooctano (Riedel), 0,3 mL de agua Milli-Q y 20 mg/mL de crudo enzimático (nativo o recombinante). Todos los reactivos utilizados fueron de gran pureza. La reacción se llevó a cabo a 28 °C y con una fuerte agitación magnética. La mezcla de reacción sin tratar fue usada como control.

Cada 24h se tomaron muestras de 200 µL que se centrifugaron 10 min a 8.000 rpm a temperatura ambiente en una centrifuga Eppendorf *mini spin*. Del sobrenadante se tomaron 50 µL que se trasvasaron a viales de cromatografía y se diluyeron con 200 µL de isooctano y 250 µL de patrón interno: ácido láurico (= dodecanoico) (Sigma-Aldrich) 20 mM en isooctano.

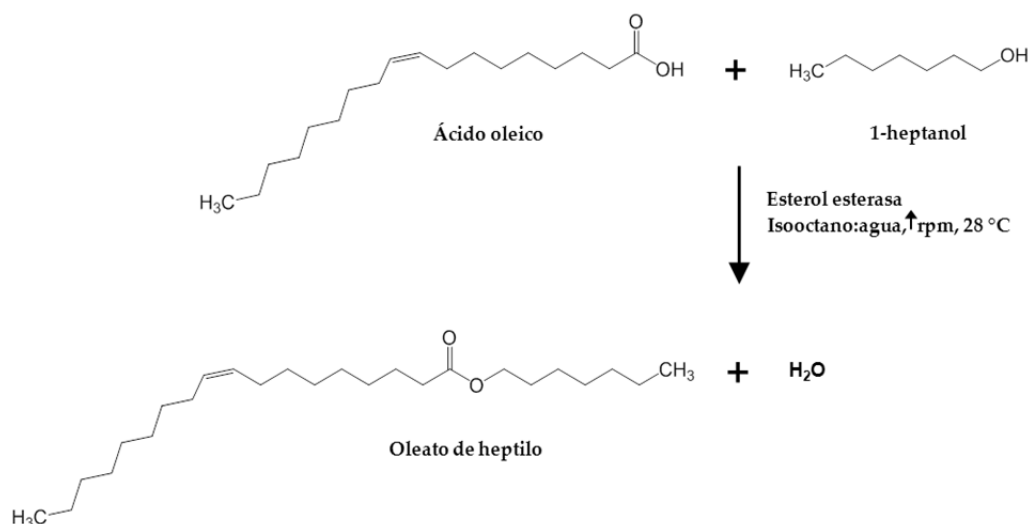


Figura 2.12. Reacción de síntesis de oleato de heptilo. Se exponen las fórmulas estructurales de las especies reactivas y del producto.

Las muestras así preparadas se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se empleó un equipo GC-MS 7980A-5975C de Agilent Technologies con una columna HP-5MS 30 m x 250 µm x 0,25 µm. El volumen de muestra usado para el análisis cromatográfico fue de 1 µL. Como gas portador se empleó helio a un flujo de 1,06 mL/min y una presión de 15,14 psi (~0,10 MPa, en el S.I.). El *split* o divisor de flujo fue de 50:1. La temperatura del inyector fue fijada a 350 °C, la del detector a 230 °C la fuente de ionización y 150 °C el cuadrupolo. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C, 2 min y se programó una rampa de 13 °C/min hasta 250 °C, manteniendo a esta temperatura 6 min. El tiempo de carrera fue de 20 min. Para la adquisición y análisis de los datos se empleó el programa *MSD ChemStation E.02.00.493* de Agilent Technologies, Inc. La cuantificación de sustratos y productos se hizo a partir de rectas que representaban sus factores de respuesta respecto del patrón interno. Las tres rectas obtenidas (ácido oleico, 1-heptanol y oleato de heptilo) tuvieron coeficientes de correlación $\geq 0,99$.

-Materiales y métodos-

2.12.2.2. Síntesis de ésteres de fitoesteros con ácidos grasos

2.12.2.2.1. Identificación de fitoesteros

Para la producción de ésteres de fitoesteros se partió de una mezcla de distintos esteroides vegetales en los que el β -sitosterol es el mayoritario (60%) de Sigma-Aldrich. Para la identificación del resto de fitoesteros se preparó una solución 97 mM del producto en tolueno y 1 μ L de ésta se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas empleando un equipo GC-MS 7980A-5975C y una columna HP-5MS 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m. Como gas portador se empleó helio a una presión de 11,2 psi (~0,077 MPa) y el flujo divisor fue de 50:1. La temperatura del inyector se fijó a 310 °C, la de la columna se mantuvo a 175 °C durante 1 min, después se aumentó hasta 310 °C a razón de 10 °C/min y, por último, se mantuvo a esta temperatura 5 min. El tiempo de carrera fue de 18 min. Para la adquisición y análisis de los datos se empleó el programa *MSD ChemStation E.02.00.493*. La identificación de los distintos picos se realizó a partir de los iones característicos de sus espectros de masas utilizando la librería *Wiley Registry 8th Ed.* con *Nist 05 MS Spectra*.

2.12.2.2.2. Síntesis de ésteres de fitoesteros

Como sustratos de la enzima se emplearon ácido láurico y la mezcla de esteroides comercial. Las reacciones se desarrollaron en sistemas bifásicos y monofásicos. Los sistemas bifásicos se formaron tras mezclar una fase orgánica con una fase acuosa, de modo que ésta última supuso el 10% (v/v) del volumen total de la reacción. Los sistemas monofásicos consistieron en una única fase orgánica. Como solventes orgánicos se seleccionaron isooctano, n-hexano y tolueno (**tabla 2.31**), de gran pureza. La fase acuosa fue agua Milli-Q. Como biocatalizadores se usaron crudos enzimáticos concentrados y liofilizados de las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae* y uno comercial correspondiente a la "lipasa tipo VII" de *C. rugosa* (Sigma-Aldrich).

Las reacciones de síntesis se realizaron en tubos Pyrex® de 10 mL de capacidad, con tapón a rosca y junta de teflón. Los sustratos se añadieron a los tubos a la concentración deseada (10, 20, 25 ó 30 mM para el ácido láurico y 5 ó 10 mM para el β -sitosterol), teniendo en cuenta que el volumen final de reacción fue de 3,3 mL, independientemente del sistema ensayado, y se disolvieron con el solvente orgánico con ayuda de un vórtex. Aunque según el solvente los sustratos fueron más o menos solubles, los tubos se incubaron durante 5 a 10 min en agua hirviendo para facilitar su total disolución. Una vez atemperados a temperatura ambiente se añadió un volumen de agua Milli-Q, equivalente al 10% del volumen de reacción, para los sistemas bifásicos. Por último, las reacciones fueron iniciadas con la adición de las enzimas en dosis de 1,5 a 12 U/mL de reacción (actividad sobre *p*NPB) y se llevaron a cabo a 28 °C, con fuerte agitación magnética (1.200 rpm). Las mezclas de reacción sin tratar fueron usadas como controles. A distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de 100 μ L y se diluyeron 10 veces con isooctano. Tras mezclar en vórtex, se centrifugaron 10 min a 7.500 rpm a temperatura ambiente, en una centrifuga Eppendorf 5424. Después, se tomaron 200 μ L de la dilución centrifugada y se añadieron a viales de cromatografía para diluirlos con 200 μ L de patrón interno (oleato de colesterilo 0,5 mM en isooctano).

Las muestras preparadas de este modo se analizaron mediante cromatografía de gases empleando un equipo *GC-System 7890A* (Agilent Technologies), con una columna Supelco SPB-1: 350 °C 5 m x 250 μ m x 0,25 μ m. El volumen a inyectar fue de 1 μ L. Como gas portador se empleó helio a una presión de 20 psi (~0,138 MPa). El divisor se ajustó a una relación de 50:1. Las temperaturas del inyector y detector FID fueron fijadas a 350 °C. La columna se mantuvo a 115 °C durante 1 min e inmediatamente se aumentó su temperatura hasta 170 °C, a razón de 10 °C/min, y, por último, se programó una segunda rampa de 20 °C/min hasta 350 °C, manteniendo a ese valor 1 min. El tiempo de carrera fue de 15 min.

La adquisición y análisis de datos se hizo con el programa *GC ChemStation Rev.B.04.02 (96)* de Agilent Technologies (2001-2009). La cuantificación de los sustratos (ácido láurico y todos los fitoesteros

tratados en conjunto) y productos de la reacción (ésteres de fitoesteres analizados como un único pico) se formalizó a partir de sus factores de respuesta respecto a oleato de colesterol. Las rectas obtenidas poseyeron coeficientes de correlación $\geq 0,99$.

Todos los análisis cromatográficos fueron efectuados en el servicio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas del CIB.

Tabla 2.31. Características solventes orgánicos

	PM (g/mol)	ρ (g/mL) ^a	log P_{oa}	ϵ	δ (MPa) ^{1/2}
Tolueno	92,14	0,865	2,5	2,38 (25 °C)	18,3
n-Hexano	86,18	0,659	3,5	1,89 (20 °C)	14,9
Isooctano	114,23	0,692	4,5	1,94 (20 °C)	14,3

^a25 °C

log P_{oa} : coeficiente de partición. Se define como la razón de la concentración de una sustancia en dos fases inmiscibles en el equilibrio (octanol y agua).

ϵ : constante dieléctrica o permitividad relativa (IUPAC). Se define como una medida de la habilidad de un solvente para separar iones. En general, los compuestos iónicos son más solubles en solventes con alta ϵ . Se puede tomar como una medida de la polaridad del solvente de modo que a mayor ϵ mayor polaridad. Normalmente, un compuesto con una constante por debajo de 15 es considerado no polar.

δ : parámetro de solubilidad de Hildebrand. Da idea de la miscibilidad de los solventes y de los distintos compuestos en los distintos solventes (Belmares *et al.*, 2004). Las unidades que se indican son las del Sistema Internacional

2.13. INGENIERÍA ENZIMÁTICA: INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA Y CARACTERIZACIÓN

2.13.1. Preparación del biocatalizador inmovilizado

La enzima nativa se inmovilizó en un nuevo soporte basado en poliacrilato con grupos epoxi activados llamado *Dilbeads*TM TA (Torres *et al.*, 2008). Esta tarea se realizó en colaboración con el Dr. F.J. Plou del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC.

Para preparar el biocatalizador inmovilizado se mezclaron 5 mL de crudo enzimático concentrado de *O. piceae* en tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 8,0 con 1 g del soporte y se incubó durante 72 h a 4 °C en un rodillo giratorio. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró a través de un filtro de microfibras de vidrio (Whatman), se lavó 3 veces con tampón fosfato potásico 1 M, pH 8,0; y en último lugar, el inmovilizado se secó a vacío y se almacenó a 4 °C

2.13.2. Caracterización del biocatalizador inmovilizado

2.13.2.1. Caracterización mediante microscopía confocal

Mediante microscopía confocal se pudo estudiar la distribución de la enzima en el soporte. Para ello, la proteína, pura en este caso, se marcó previamente a la inmovilización con isotiocianato de fluoresceína: la proteína a marcar se disolvió en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,0 a una concentración de unos 4,5 mg/mL. A esta solución se le añadió el isotiocianato disuelto en dimetilformamida (5 μ L por cada mg de proteína) y la mezcla se incubó 1 h a temperatura ambiente. Con una columna de tipo PD-10 (GE Healthcare) se separó la proteína marcada del fluoróforo no unido.

El biocatalizador inmovilizado marcado se analizó con un microscopio láser confocal espectral (CLSM, *Confocal laser scanning microscopy*) Leica TCS SP2, equipado con 9 líneas de láser y sistemas AOTF y AOBS y el programa para la adquisición y procesamiento de imágenes. Las muestras se visualizaron con el

-Materiales y métodos-

objetivo de 40,0 x 1,25 y una apertura del orificio de 1,50 Airy (122 μm). La longitud de onda de excitación del láser se estableció en 488 nm y la fluorescencia emitida por el isotiocianato de fluoresceína se detectó a 520 nm.

2.13.2.2. Caracterización bioquímica

El efecto del pH y la temperatura en la velocidad de hidrólisis del biocatalizador inmovilizado, así como su estabilidad al pH y a la temperatura se estudió utilizando suspensiones de biocatalizador de 0,5 mg/mL en tampón CFB 20 mM.

Para el estudio del pH óptimo, el inmovilizado se dispersó en tampón CFB 20 mM a diferentes valores de pH (6,0-9,0). Para el estudio de la temperatura óptima se empleó el tampón a pH 6,0 y la enzima inmovilizada se preincubó a cada temperatura (en el intervalo 4-95 °C) durante 5 min.

La estabilidad al pH se midió a 25 °C empleando el tampón a los distintos valores de pH y durante diferentes tiempos de reacción. Los estudios de termoestabilidad se desarrollaron en el tampón a pH 6,0 y a las diferentes temperaturas (30-60 °C) tomando alícuotas a diferentes tiempos de incubación.

En cada uno de los ensayos la actividad residual frente a *p*NPB 1,5 mM se obtuvo a partir de reacciones de 10 min de duración. Cada minuto se tomaba una muestra para comprobar, mediante espectroscopía, la linealidad en la liberación de producto. La actividad se corrigió con los controles de hidrólisis espontánea del sustrato para cada situación.

2.13.2.3. Aplicación del biocatalizador inmovilizado

Aproximadamente 1 g de la enzima inmovilizada, según lo descrito, se empaquetó en una columna de tipo HR 5/5 0,5 x 5 cm, 1 mL (GE Healthcare). A esta columna se le conectó una bomba peristáltica (modelo P-1, GE Healthcare), configurando un sistema sin retorno (**figura 2.13**). A través del reactor se hizo pasar a un flujo de 15 mL/h una solución de oleato de colesterilo (2 g/L) en Tris-HCl 1 mM, pH 8,0 conteniendo KCl 0,1 M y Genapol X-100 al 10% (v/v). La homogeneidad de esta solución se mantuvo mediante agitación magnética.

El tiempo cero de la reacción se estableció una vez que el sistema se había equilibrado tras pasar al menos 10 volúmenes de columna de la solución. A partir de este momento, se obtuvieron muestras a la salida del reactor a diferentes tiempos. Éstas fueron centrifugadas durante 5 min a 6.000 rpm en Eppendorfs con membranas Durapore® de 0,45 μm (Millipore) y analizadas por HPLC. El análisis cromatográfico se llevó a cabo empleando una columna Nucleosil C-18 4,6x150 mm (Análisis Vínicos, España) mantenida a 30 °C y utilizando como fase móvil acetonitrilo:2-propanol 60:40 (v/v), acondicionada con helio, a un flujo de 1,0 mL/min y operando en modo isocrático (bomba modelo 515, Waters). Las muestras se siguieron a una longitud de onda de 206 nm con un detector UV-Vis modelo 9040 (Spectra-Physics). La adquisición y análisis de los datos se llevó a cabo bajo el entorno de trabajo *Varian Star Chromatography* 6,41.

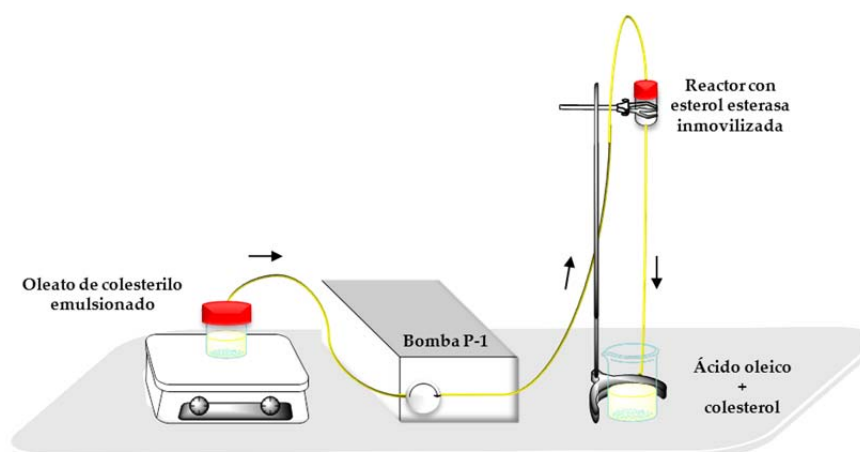


Figura 2.13. Montaje del reactor enzimático (esterol esterasa inmovilizada y empaquetada en columna HR 5/5) para el estudio de la hidrólisis continua de oleato de colesterol.

2.14. ESTUDIOS DE CRISTALIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA

La enzima pura concentrada a unos 4 mg/mL, en ausencia y presencia de Triton X-100 en forma reducida para evitar su precipitación, se utilizó para experimentos de cristalización. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. J. Hermoso del Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC.

Por un lado, se llevaron a cabo cribados comerciales para el análisis del comportamiento de la enzima al precipitar en las distintas condiciones y tratar de establecer un punto de partida para maximizar el éxito de la cristalización. Se emplearon el *Crystal Screen I* y *II*, *Index*TM, *Salt RX* (los tres de Hampton Research) y *JCSG Suite* (Qiagen). Cada uno de ellos constaba de 96 condiciones diferentes y mediante un dispensador Gilson se trasladaron a un formato de placa de 96 pocillos, con 65 μ L/pocillo de las diferentes condiciones. Con las placas preparadas, se iniciaron los experimentos preliminares de cristalización con la técnica de difusión de vapor denominada “gota posada” (**figura 2.14A**) empleando un nanodispensador Innovadyne con una condición de gota de 1:1 (250 nL de proteína + 250 nL del reservorio).

Por otro lado, se realizaron cribados manualmente, en formato de placa de 24 pocillos, en torno a las mejores condiciones obtenidas. En concreto, se diseñaron experimentos de cristalización con base en: i) PEG1500/pH combinando concentraciones de entre el 16-27% (p/v) del precipitante y un intervalo de pH de 5-8, ii) PEG3350/fosfato sódico-potásico con concentraciones de PEG3350 del 14-24% (p/v) y de fosfato de 0 a 0,3 M y iii) los comerciales *JBScreen Classic 7* basado en MPD (2-metil-2,4-pentanediol) como precipitante (Jena Bioscience) y *Detergent Screen 1, 2 y 3* (Hampton Research). En todos estos casos, cada uno de los pocillos presentaba un volumen de 500 μ L de condición madre y se usó la técnica de difusión de vapor de “la gota colgante” (**figura 2.14B**) siendo la condición de gota en todos ellos de 1:1 (1 μ L de proteína + 1 μ L del reservorio).

Las dos técnicas empleadas se basan en alcanzar un grado de sobresaturación de la muestra de proteína mediante difusión de vapor entre la solución madre y la de proteína. Debido al intercambio de vapor entre ambas, disminuye el tamaño de la gota que contiene la proteína aumentando la saturación de la solución haciendo que se formen unos pocos centros de nucleación a partir de los cuales crecerán los cristales. Las ventajas de la “gota posada” son su rapidez y sencillez haciéndola idónea para cribados y optimización mientras que la “gota colgante” facilita la visualización y recuperación de los cristales aunque necesita mayor tiempo para alcanzar el equilibrio.

-Materiales y métodos-

En total se estudiaron 880 condiciones diferentes de cristalización a 16 °C.

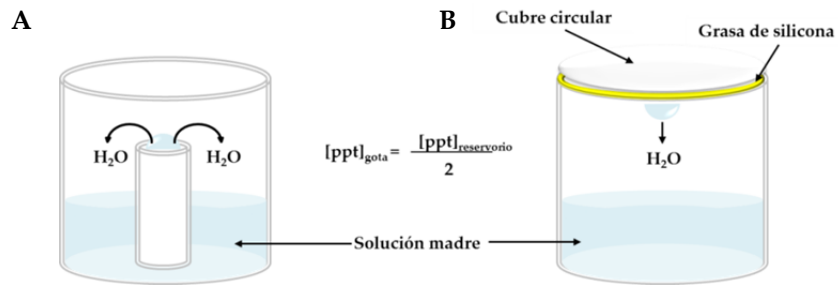


Figura 2.14. Técnicas de cristalización de proteínas. A) "Gota posada" y B) "gota colgante". *ppt*: precipitante.

3. RESULTADOS

3.1. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA NATIVA DE *O. piceae*

La producción de la enzima por *O. piceae* se llevó a cabo en el medio basal suplementado con 0,5% de aceite de oliva. Después de 3 días de incubación, la glucosa presente en el medio fue totalmente consumida por el hongo, momento en el cual comenzó la producción de la esterasa (aunque el hongo continuó creciendo utilizando el aceite del medio como fuente de carbono). Tras 12 días de incubación, la producción de la esterasa alcanzó su valor máximo (~1,6 U/mL) manteniéndose prácticamente constante hasta el final del cultivo (Calero-Rueda *et al.*, 2002). La **figura 3.1** muestra la evolución de diferentes parámetros estudiados durante los cultivos del ascomiceto.

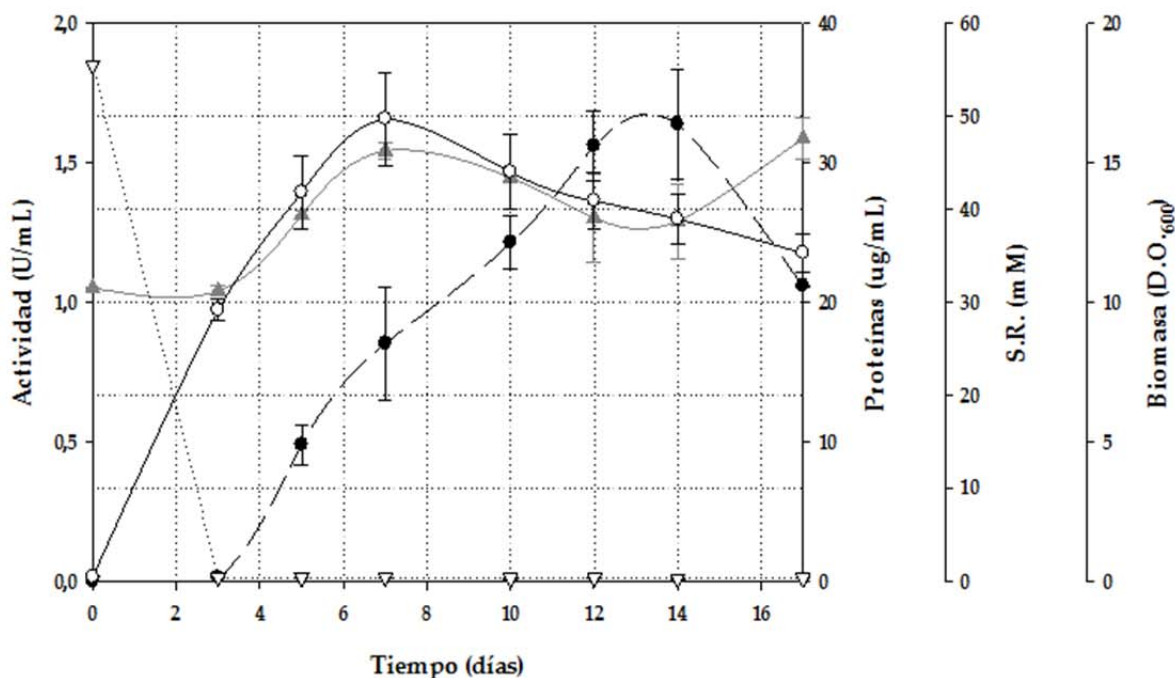


Figura 3.1. Evolución de los cultivos de *O. piceae* suplementados con aceite de oliva (0,5%): Actividad (*p*NPB) (●); [proteínas] (▲); [Sustancias Reductoras] [S.R.] (▽) y Biomasa (*D.O.*₆₀₀) (○). Los valores representados son la media de dos experimentos, las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

3.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ESTERASA DE *O. piceae* EN *P. pastoris*

3.2.1. Selección de transformantes His⁺Mut⁺

Dado que la transformación en *P. pastoris* ocurre por integración del ADN recombinante en el gen *aox1* del genoma de la levadura por recombinación homóloga, puede existir cierta variabilidad en los niveles de expresión de los distintos transformantes (variación clonal). Así, diferentes transformantes His⁺Mut⁺ fueron chequeados en placas MM-tributirina para comprobar su expresión y en medio BMMY para comprobar los niveles alcanzados (**figura 3.2**) (Calero-Rueda *et al.*, 2009). Todos los transformantes se ensayaron frente a un control representado por la cepa GS115 transformada con el plásmido parental (pPIC9).

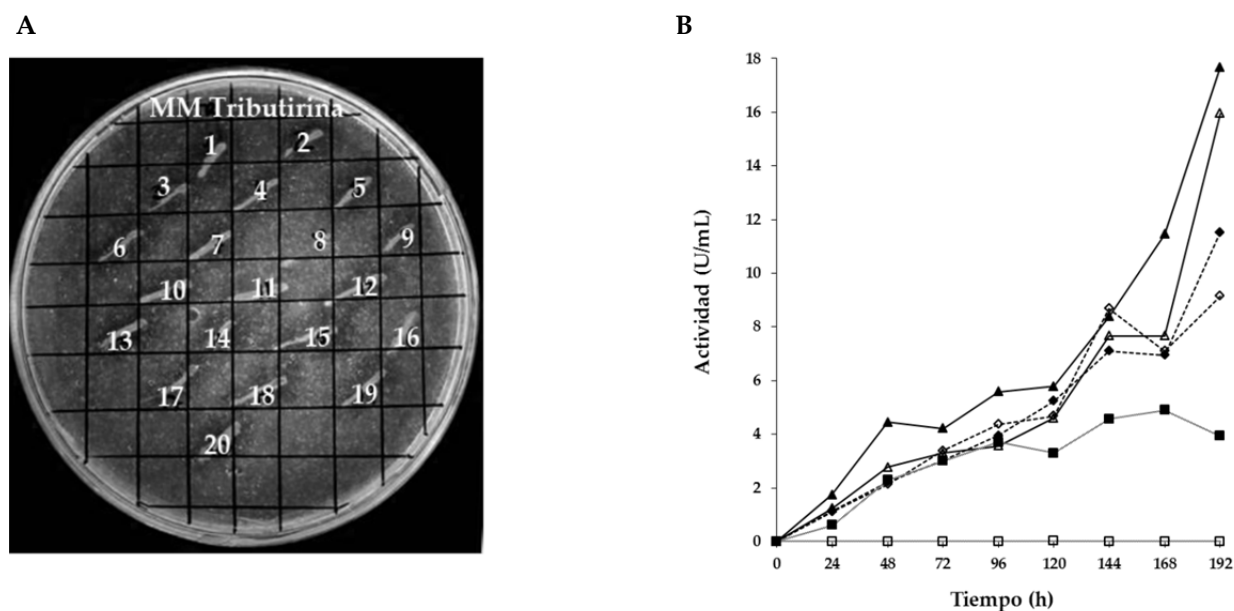


Figura 3.2. Selección de transformantes His⁺Mut⁺ en placa MM-tributirina (A), obsérvese los halos de hidrólisis y en medio BMMY (B): Actividad *vs* pNPB; transformante 1 (▲), transformante 2 (◆), transformante 3 (◇), transformante 5 (△), transformante 7 (■) y control (□). Los valores representados son la media de al menos tres experimentos, la desviación estándar fue inferior al 7-10% de los valores (Calero-Rueda *et al.*, 2009).

De entre todos los transformantes se seleccionó al 1 como máximo productor de esterasa recombinante para realizar estudios de producción.

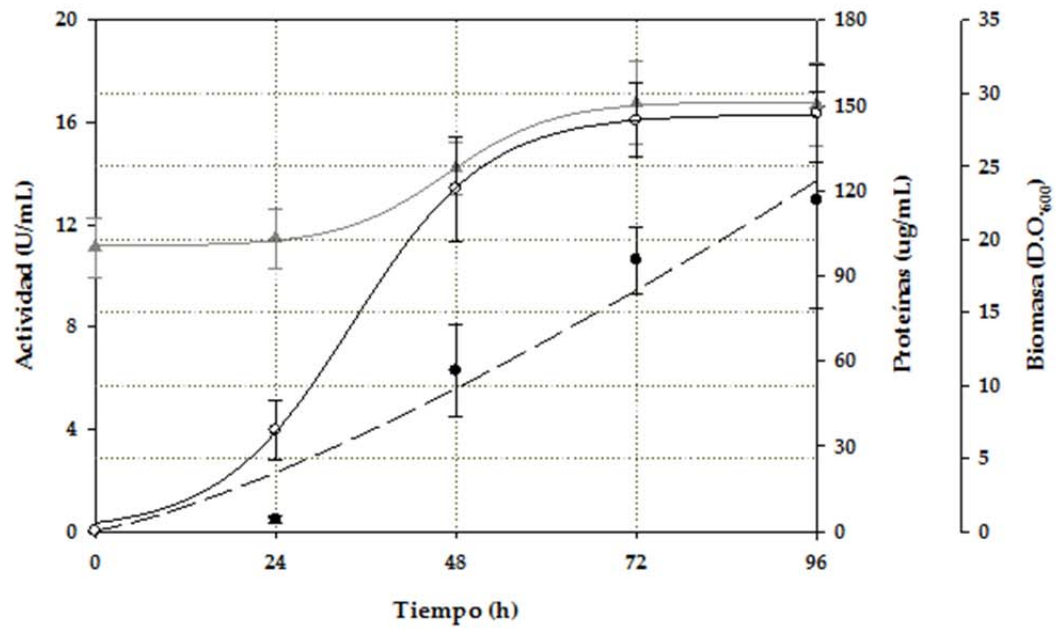
3.2.2. Estudios de expresión del transformante Mut⁺ en Erlenmeyer

El propósito de estos estudios fue determinar las condiciones óptimas para la producción de la enzima. Se utilizaron una serie de medios de cultivo que reunían características distintas. Por un lado, se emplearon tres tipos de medios tamponados (BMMY, BMM y YEPS), indicados para la producción de enzimas si el pH es un factor importante que pueda afectar a su actividad. Por otro lado, se usó un medio de cultivo no tamponado (MM) indicado para la inactivación de proteasas con actividad óptima a pH neutro.

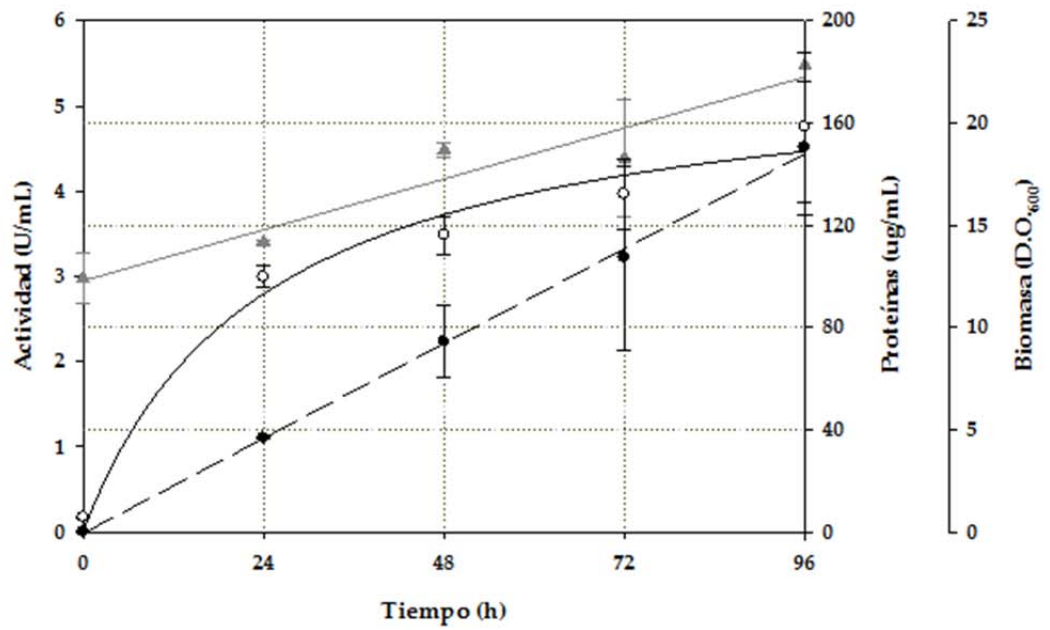
La producción se llevó a cabo a pequeña escala en matraces Erlenmeyer en dos etapas (salvo con el medio YEPS): una primera etapa de generación de biomasa en un medio en el que la expresión está reprimida por la presencia de glicerol, seguida de una fase de producción en la que las células son inducidas con metanol 5 g/L.

Las mejores producciones, medidas como actividad frente a pNPB, se obtuvieron con los medios complejos tamponados YEPS (figura 3.3A) y BMMY (figura 3.3B), alcanzando niveles de actividad tres veces mayores con el primero de ellos. En el caso de los medios mínimos la actividad fue mucho menor, en el medio BMM (figura 3.3C) fue 10 veces inferior respecto de su equivalente complejo; en el MM apenas se detectó actividad significativa (figura 3.3D) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

A

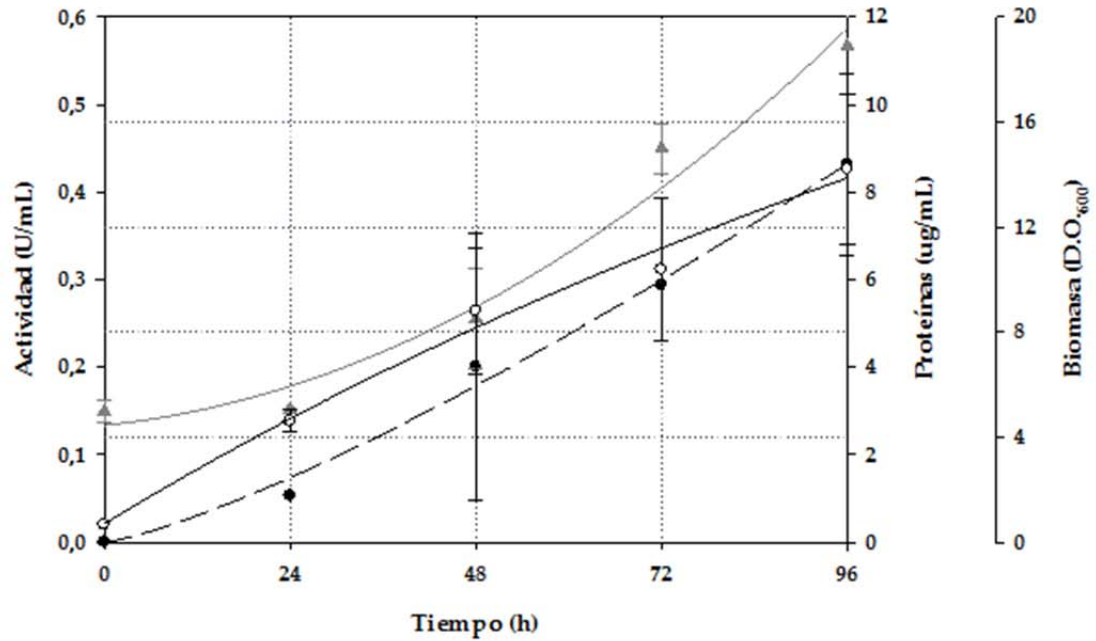


B



-Resultados-

C



D

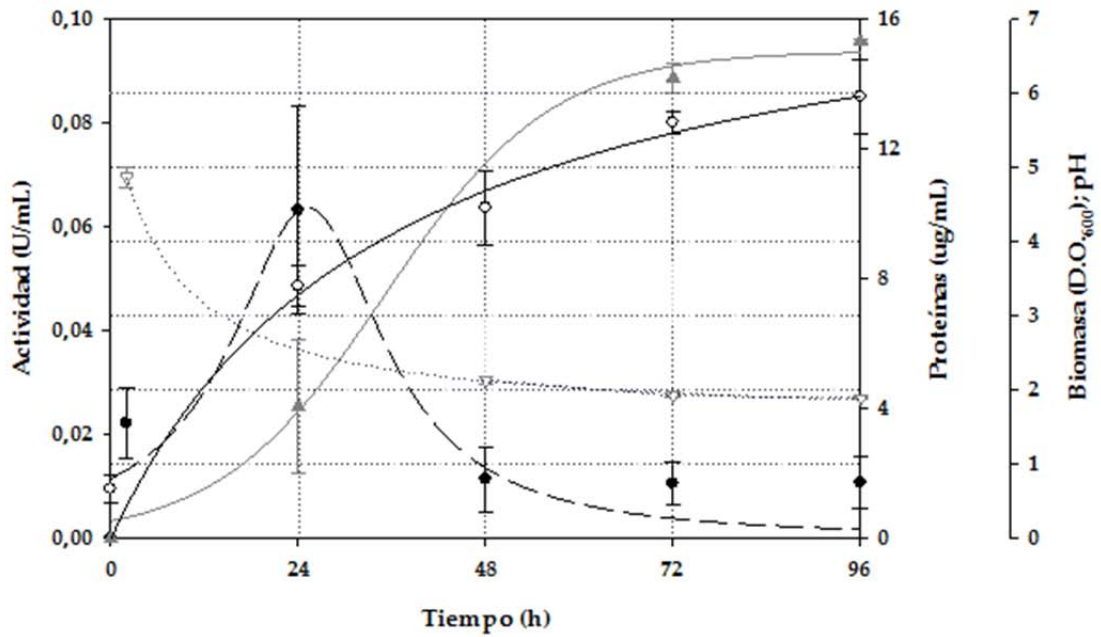


Figura 3.3. Producción de esterasa recombinante en diferentes medios de cultivo: medio YEPS (A), medio BMMY (B), medio BMM (C) y medio MM (D). Actividad *vs* pNPB (●), proteínas (▲), D.O.₆₀₀ (○) y pH (▽). Los datos representan al menos la media de dos experimentos diferentes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los datos experimentales se ajustaron a distintas curvas usando SigmaPlot 11.0 (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

Con los medios complejos se obtuvieron niveles de enzima superiores a los conseguidos con *O. piceae* y en un menor tiempo de incubación. Del orden de 8 veces más actividad se alcanzó con el medio YEPS, en el mejor de los casos ensayados, y 2,7 veces más con el BMMY.

3.2.3. Estudios de inducción/desrepresión de pAOX1

Este promotor está controlado por un sistema de represión/desrepresión y de inducción donde el metanol actúa como inductor y otras fuentes de carbono, tales como glucosa o glicerol, como represores. Por otro lado, el sorbitol ha sido descrito como una fuente de carbono que no reprime a este promotor (Inan y Meagher, 2001). El efecto de esta fuente de carbono sobre la expresión heteróloga de OPE en matraces Erlenmeyer se ha estudiado utilizando cuatro formulaciones diferentes a partir del medio YEPS: i) medio YEP, ii) este medio con metanol (YEP + I), iii) medio YEP con sorbitol (YEPS), y iv) YEPS con metanol (YEPS + I).

La **figura 3.4A** muestra la actividad esterasa secretada en los cuatro medios de cultivo. Como era de esperar, los niveles de actividad más altos se lograron en cultivos con sorbitol y metanol, alcanzando alrededor de 16 U / ml después de 96 horas de incubación. En ausencia de sorbitol, los niveles de actividad eran alrededor de 2,4 U/ml. Aunque en ausencia de metanol sería de esperar que no hubiera producción de esterasa, se han detectado 6 y 0,5 U / ml, respectivamente, en los medios no inducidos YEPS y YEP. Los perfiles de SDS-PAGE de extractos crudos obtenidos en las cuatro condiciones ensayadas (**figura 3.4B**) están de acuerdo con estos resultados, que muestran bandas más intensas en los medios con mayor actividad esterasa (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

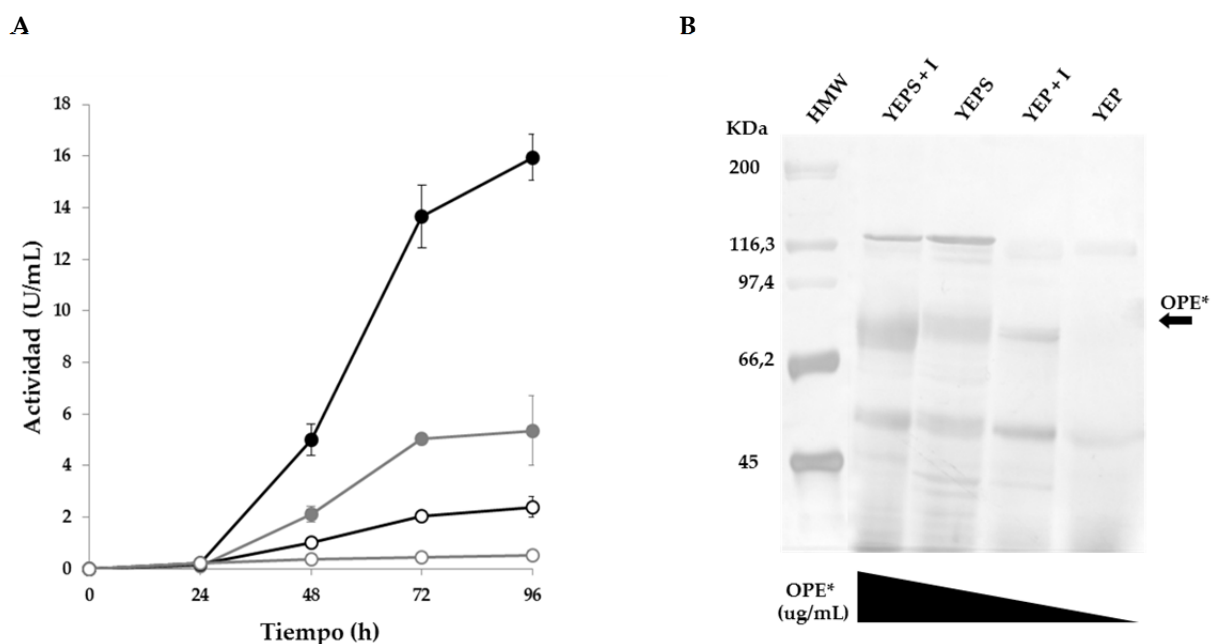


Figura 3.4. Influencia del sorbitol sobre la inducción/desrepresión de pAOX1. Niveles de actividad *vs* pNPB(A): YEP (○), YEP + I (○●), YEPS (●) y YEPS + I (●●). Los estudios se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 25 mL de cada medio a 28 °C y 250 rpm. Las barras de error representan la desviación estándar de la media de los datos de dos experimentos distintos. Análisis por PAGE-SDS y tinción con plata de los extractos extracelulares obtenidos (B) (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

-Resultados-

La concentración de metanol es fundamental para conseguir altos niveles de proteínas recombinantes en cepas de *P. pastoris* utilizando pAOX1. La optimización de este parámetro es de especial interés, ya que se debe añadir diariamente para mantener la inducción y contrarrestar su evaporación. Se ensayaron dos concentraciones de metanol (5 y 10 g/L) en medio YEPS. En general, la concentración de inductor se correlacionó positivamente con la biomasa y la proteína total. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de actividad secretadas a ambas concentraciones de metanol (**figura 3.5**), aunque algún efecto inhibitorio apareció al emplear 10 g/L teniendo en cuenta la actividad específica en base a la biomasa generada. Teniendo en cuenta estos resultados, se han de usar concentraciones inferiores a 5 g/L de metanol para evitar la inhibición y reducir el coste global del proceso durante la producción de la esterasa recombinante (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

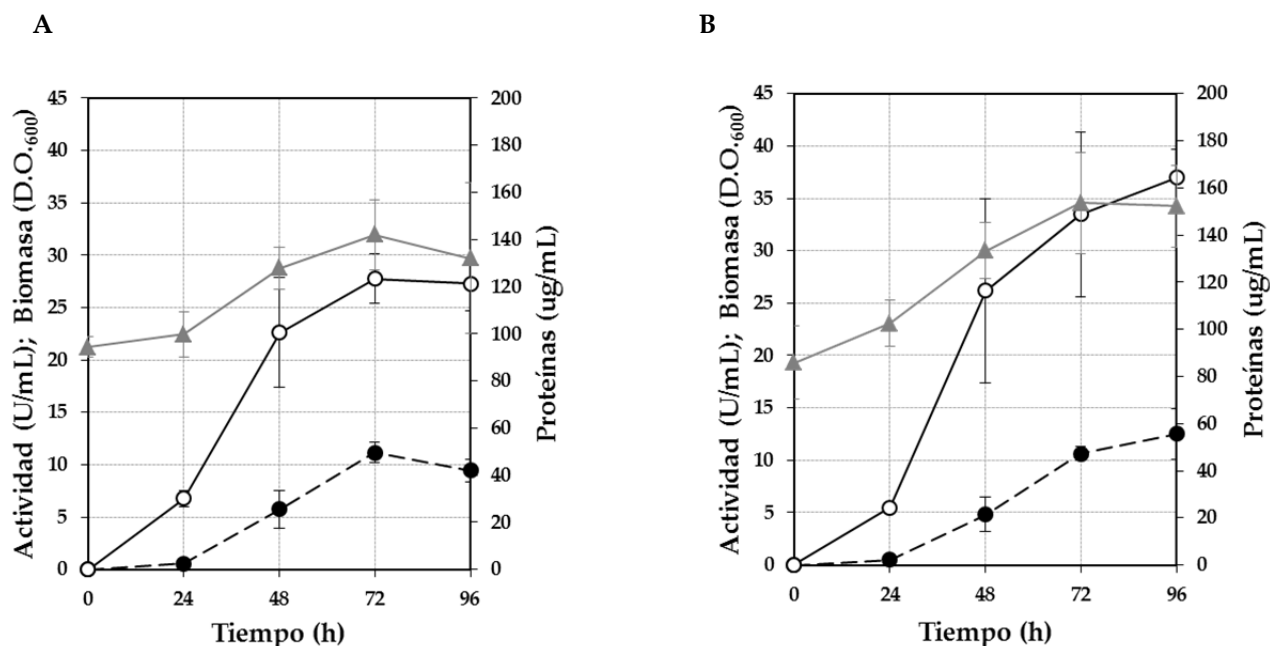


Figura 3.5. Efecto de la concentración de metanol en la expresión heteróloga de la esterasa de *O. piceae* en medio YEPS. Inducción con 5 (A) y 10 g/L (B) del alcohol. Actividad vs pNPB (●), proteínas (▲) y biomasa (○). Las barras de error representan la desviación estándar de la media de los datos de tres experimentos diferentes (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE. COMPARACIÓN CON LA ENZIMA NATIVA

3.3.1. Etapas y rendimiento de la purificación

La proteína recombinante se purificó a homogeneidad a partir de cultivos en medio YEPS inducido de 4 días mediante una sola etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica usando un cartucho de octil-sefara (figura 3.6). Posteriormente, la proteína se dializó y se concentró, para eliminar el detergente empleado en su elución, y se mantuvo a -80°C, manteniéndose estable en estas condiciones, al menos durante un año. 9 mg de enzima pura se obtuvieron de 1L de medio de YEPS. El rendimiento del proceso fue de alrededor de 60% y la proteína se purificó 9,2 veces (tabla 3.1) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

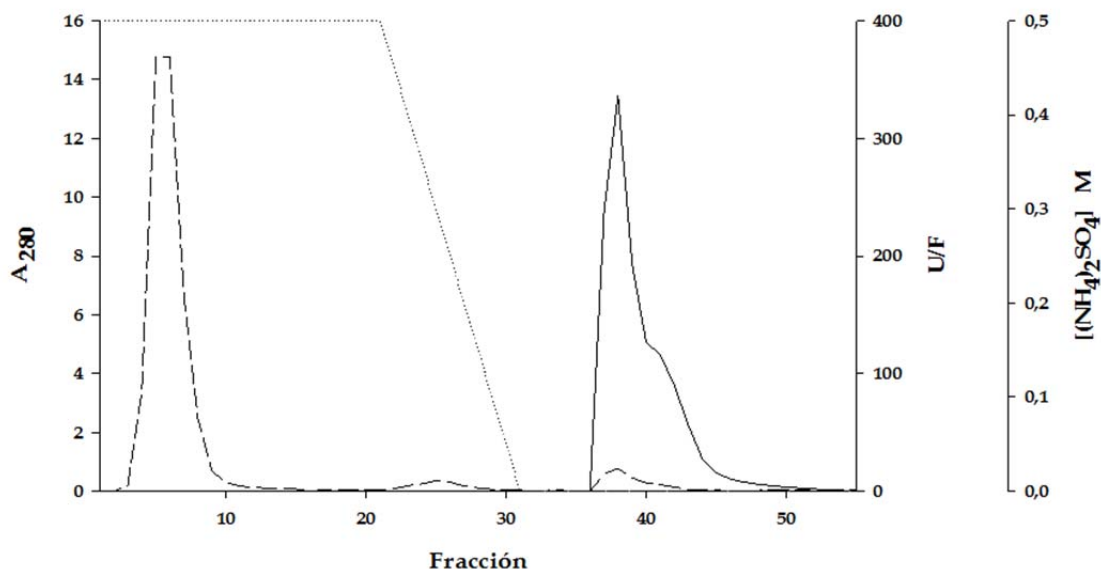


Figura 3.6. Perfil de cromatografía de interacción hidrofóbica de la purificación de la enzima recombinante: actividad *vs* pNPB (unidades por fracción, U/F) (—), A₂₈₀ (—) y gradiente (.....).

Tabla 3.1. Rendimiento y grado de purificación de la enzima recombinante

	Actividad (Unidades)	Proteína (mg)	Rto. (%)	Ae (U/mg)	Factor purificación
Cultivo líquido	9539	140	100	68	1,0
Ultrafiltrado	9839	89	103	111	1,6
HIC-octil sefarosa y eliminación Triton X-100	5624	9	59	625	9,2

Rto.: Rendimiento; Ae: actividad específica

3.3.2. Características fisicoquímicas

3.3.2.1. Masa molecular y grado de glicosilación

La proteína recombinante pura mostró una banda a Mr 76.000 Da en SDS-PAGE, más alto que el descrito para la enzima nativa (60 kDa); lo cual podría ser debido a diferentes patrones de modificaciones pos-traduccionales. Esto se confirmó tras el tratamiento de la enzima con endoglicosidasa H (**figura 3.7A**). Este resultado indicó que la proteína expresada en *P. pastoris* estaba más N-glicosilada que la proteína salvaje, presentando aproximadamente un 28% de azúcares.

La masa molecular media de la esterol esterasa recombinante fue de 74.921 Da mediante espectrometría de masas (**Figura 3.7B**) y este valor se utilizó para la determinación de sus constantes cinéticas.

-Resultados-

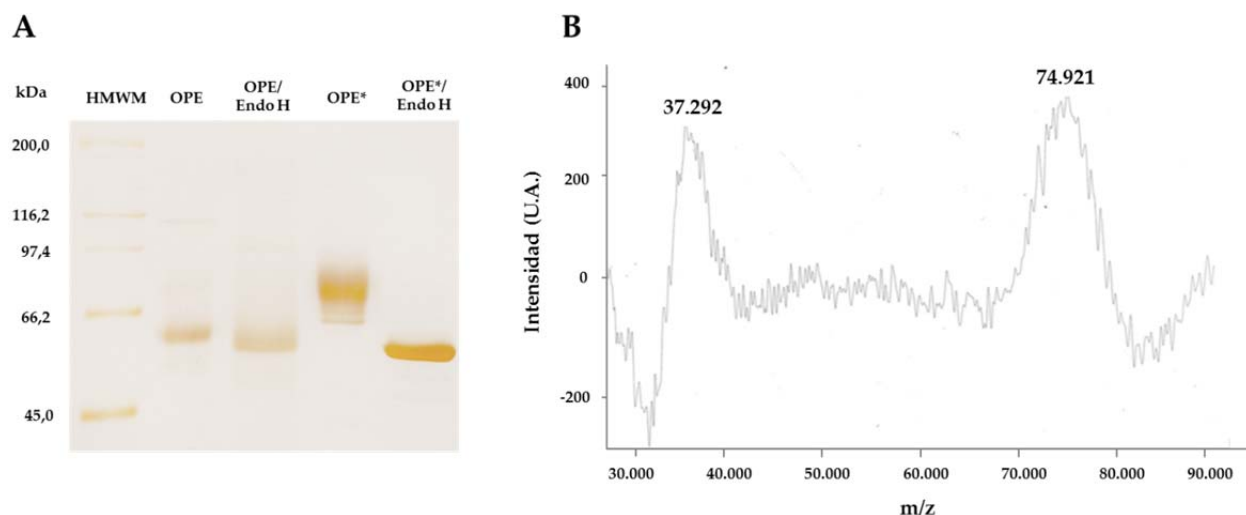


Figura 3.7. Estimación de la masa molecular de la enzima recombinante. SDS-PAGE de las enzimas nativa y recombinante puras antes y después del tratamiento con Endo H (A). HMWM: *High Molecular Weight Marker*. Las bandas de proteína están teñidas con plata. Espectro de MALDI-TOF (B).

3.3.2.2. Punto isoelectrico

El punto isoelectrico (pI) de la enzima recombinante se determinó mediante isoelectroenfoque. La desglicosilación de la proteína con Endo H fue importante para poder determinarlo (figura 3.8A) y se estimó en 4,3. La proteína sin desglicosilar migró en forma de varias bandas llegando a diferenciarse hasta tres cuando se tiñó por actividad (Figura 3.8B) con valores de pI de 5,8; 5,3 y 5,0. Este resultado está de acuerdo con el pI de la proteína estimado en 4,82 según una de las herramientas bioinformáticas de Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

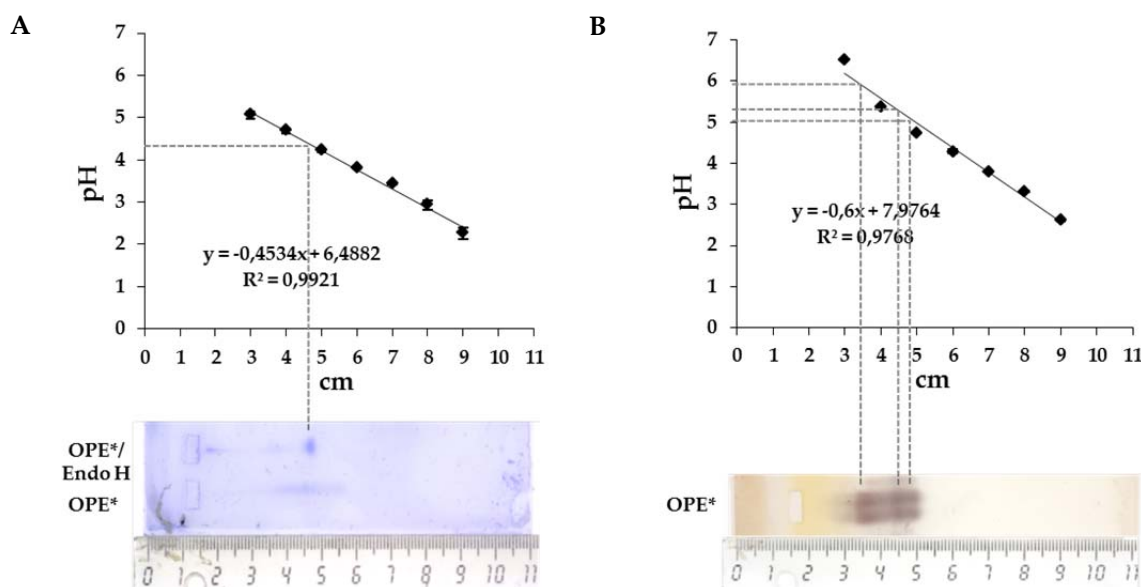


Figura 3.8. Isoelectroenfoque de la proteína recombinante. Se emplearon 5 μ g de proteína para la tinción con Coomassie (A) y 100 mU (frente a pNPB) para el zimograma (B). Los datos representados en las gráficas corresponden a la media de dos medidas de cada gradiente. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

3.3.2.3. Actividad y estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura

El pH óptimo de la proteína recombinante purificada fue de entre 7,5 y 8,0 (**figura 3.9A**). Su estabilidad fue del 50-70% de su actividad inicial después de 24 h de incubación entre pH 3,0 y pH 9,0. Sin embargo, a pH 10,0 la enzima mantiene alrededor del 50% de la actividad y esta baja más a pH más altos, sobre todo a pH 12,0 en el que pierde su actividad en minutos (**figura 3.9B**) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

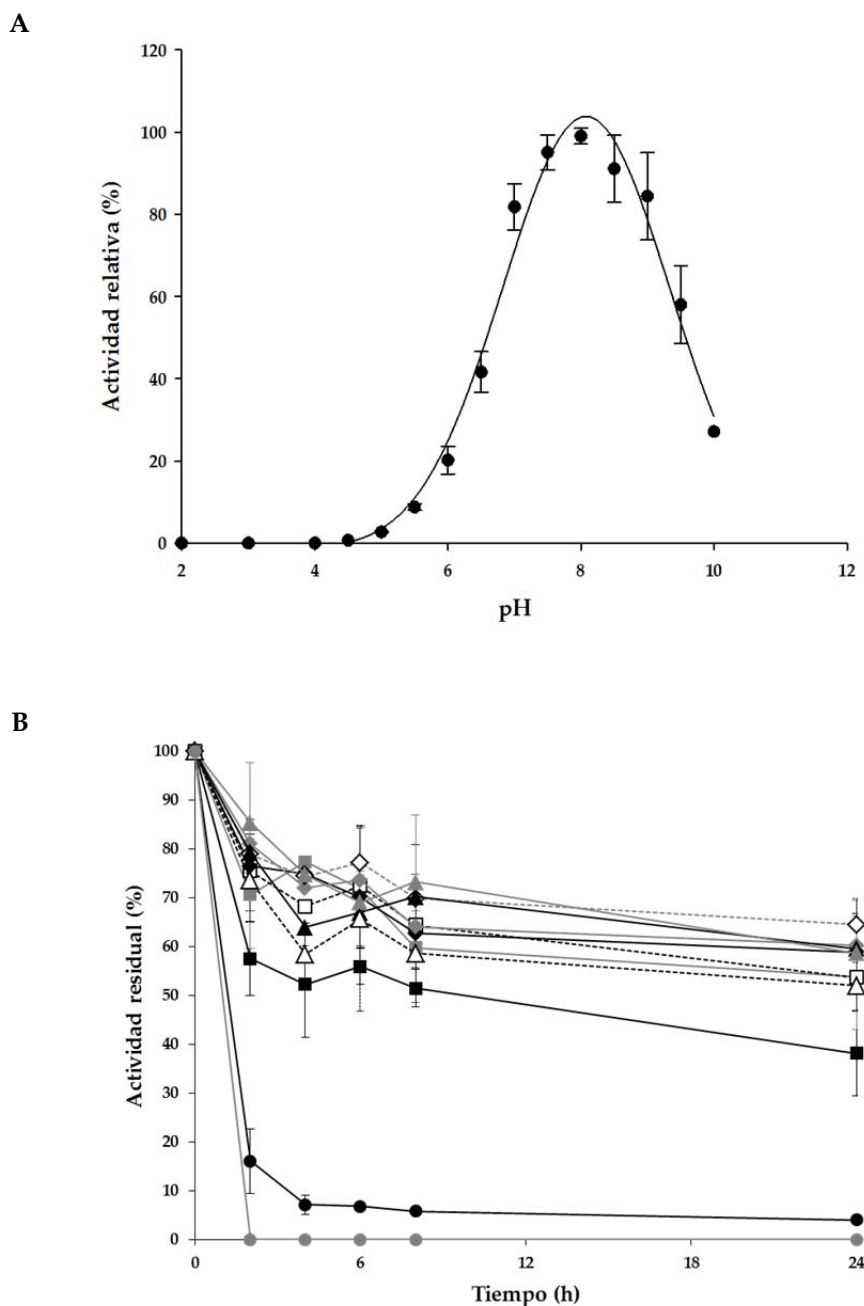


Figura 3.9. Actividad óptima de la enzima recombinante (A) y estabilidad frente al pH tras 24 h (B). En el caso del pH óptimo los valores experimentales se ajustaron estadísticamente con el programa SigmaPlot 11.0 (—). pH 2 (■), pH3 (■), pH4 (□), pH5 (◆), pH6 (◆), pH7 (◇), pH8 (▲), pH9 (▲), pH10 (△), pH11 (●) y pH12 (●). Se empleó *p*NPB como sustrato a una concentración de 1,5 mM. Los valores representan las medias de al menos tres experimentos diferentes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los datos.

-Resultados-

La comparación de las estabildades frente a pH de las enzimas nativa y recombinante puso de manifiesto un ligero incremento de estabilidad de la primera en el rango de pH comprendido entre 4 y 9, aunque su actividad fue mucho menor a pH 10 (**figura 3.10**).

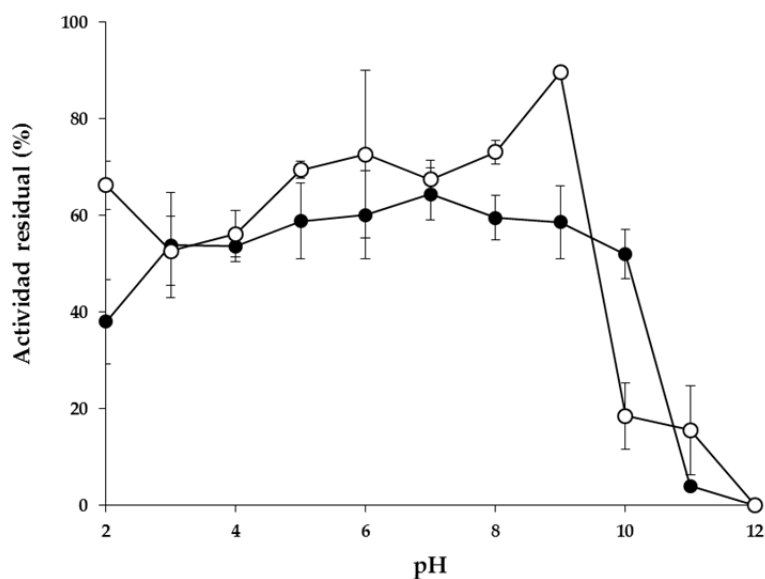
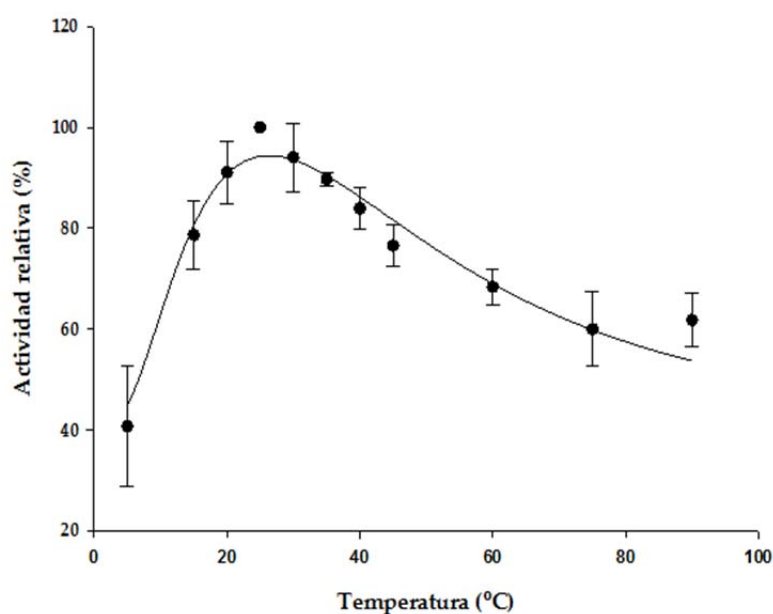


Figura 3.10. Comparación de las estabildades frente al pH, tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa y recombinante. OPE (○) y OPE* (●). Los valores representan las medias de al menos tres experimentos diferentes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los datos.

La temperatura óptima de la enzima fue de 25 °C (**figura 3.11A**). En cuanto a su estabilidad a la temperatura, mantuvo en torno al 85% de su actividad inicial a 4 y 30 °C, después de 24 h de incubación a pH 6. Sin embargo, fue menos estable a 45 °C (35% de actividad) y mantuvo menos del 10% de su actividad a 60 °C (**figura 3.11B**) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

A



B

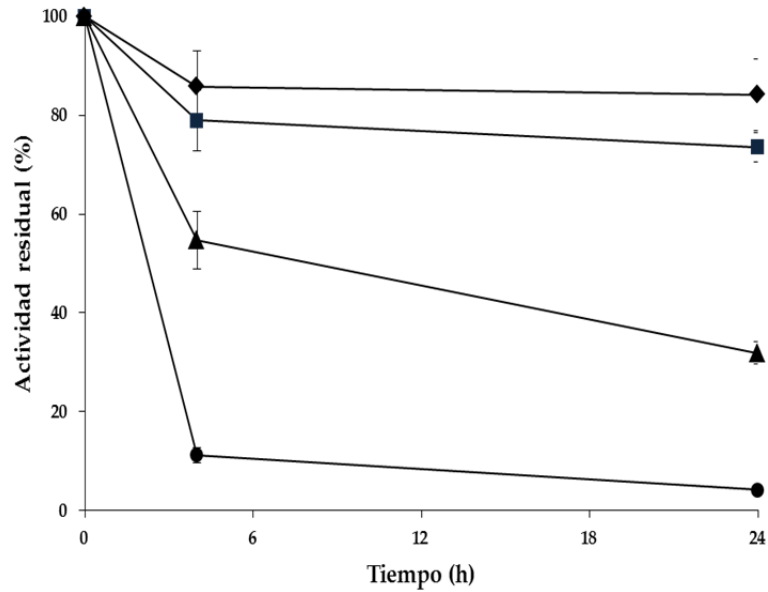


Figura 3.11. Temperatura óptima de la enzima recombinante (A) y termoestabilidad (B). En el caso de la temperatura óptima los valores experimentales se ajustaron estadísticamente con el programa SigmaPlot 11.0 (—). 5 °C (◆), 30 °C (■), 45 °C (▲) y 60 °C (●). Se empleó *p*NPB como sustrato a una concentración de 1,5 mM. Los valores representan las medias de al menos tres experimentos diferentes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los datos.

La comparación de las termoestabilidades de ambas enzimas permitió observar diferencias importantes a mayores temperaturas a las cuales la enzima nativa fue más estable (figura 3.12).

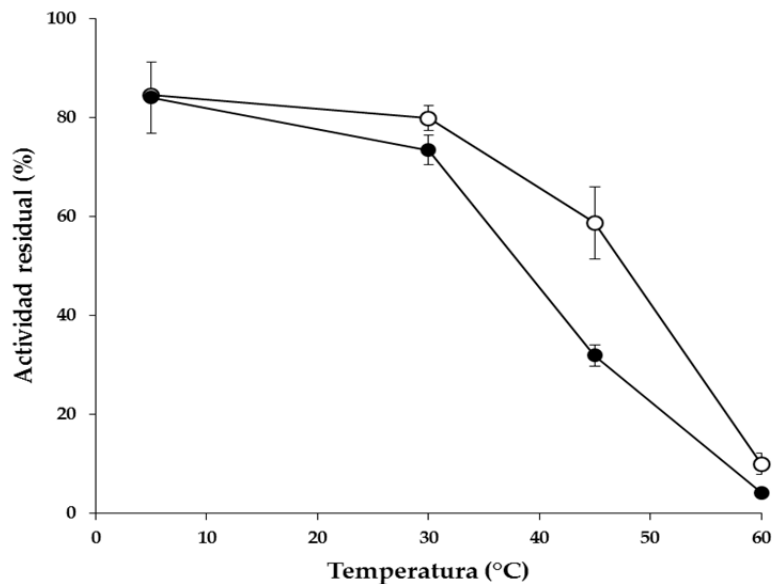


Figura 3.12. Comparación de las termoestabilidades, tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa y recombinante. OPE (○) y OPE* (●). Los valores representan las medias de al menos tres experimentos diferentes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los datos.

-Resultados-

3.3.2.4. Actividad frente a iones y detergentes

Se ensayaron aquellos iones que más afectaron la actividad de la enzima nativa (Calero-Rueda *et al.*, 2002; Calero-Rueda, 2006). Se encontró que con los iones K^+ y Mg^{2+} la enzima mantenía su actividad a cualquiera de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, con el ion NH_4^+ la actividad comenzaba a disminuir a partir de concentraciones de 1mM siendo el efecto mucho más drástico con el ión Hg^{2+} con el que a esa concentración conservaba sólo la mitad de su actividad y se reducía un 90% a una concentración de 10 mM (tabla 3.2).

Tabla 3.2. Efecto de iones en la actividad de OPE*

	0 mM	0,5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Hg²⁺	100,0±1,0	61,5±6,5	53,3±3,5	15,0±1,3	7,0±0,8
K⁺	100,0±1,4	94,8±4,7	85,7±17,2	95,9±4,2	107,0±2,1
Mg²⁺	100,0±17,5	99,3±4,7	96,0±11,8	95,1±8,1	93,8±11,0
NH₄⁺	100,0±6,7	100,8±13,3	86,4±3,2	115,3±4,9	75,8±6,9

El experimento se realizó por triplicado. Los valores indicados representan la media de los datos experimentales y su desviación estándar correspondiente.

Con respecto al efecto de los detergentes, aquellos de la familia Tween® redujeron la actividad a medida que aumentaba su concentración y también con el aumento de la longitud de la cadena del ácido graso que esterificaba al polioxietileno sorbitano. En el caso del Triton X-100 también se vio una disminución a partir de una concentración del 0,5% (v/v) (tabla 3.3).

Tabla 3.3. Efecto de detergentes en la actividad de OPE*

	0,05%	0,10%	0,20%	0,50%	1,0%
Tween® 20	93,7±8,1	75,7±2,1	85,3±2,4	63,2±10,0	52,0±5,1
Tween® 40	89,5±1,3	79,0±4,6	64,3±13,8	43,1±10,4	34,7±8,1
Tween® 60	76,1±4,4	66,3±7,8	49,2±8,4	27,8±3,2	9,6±1,8
Tween® 80	74,0±5,4	66,6±8,2	55,3±6,8	25,3±1,5	4,9±0,4
Triton X-100	102,0±8,6	87,7±12,4	92,7±4,0	51,2±4,8	28,2±2,9

3.3.3. Características cinéticas en estado estacionario

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de Genapol X-100 como tensioactivo debido a la baja solubilidad en soluciones acuosas de la mayoría de los sustratos ensayados. Los parámetros cinéticos de las proteínas se designaron como "aparentes" (ap) por tener lugar en una interfase. La **tabla 3.4** resume las propiedades catalíticas de las enzimas nativa y recombinante. A excepción del *p*NPB, la proteína recombinante mostró una afinidad similar o superior (valores más bajos de K_m^{ap}) que la nativa, y una mayor frecuencia de recambio (k_{cat}^{ap}) en todos los casos. Su eficacia (k_{cat}^{ap} / K_m^{ap}) aumentó con la longitud de la cadena acilo del sustrato, así como con la presencia de insaturaciones. La eficacia catalítica de la enzima recombinante, en comparación con la de la esterasa nativa (Calero-Rueda *et al.*, 2002), fue aproximadamente 8-10 veces más alta para todos los sustratos ensayados (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos aparentes de las esterasas nativa (Calero-Rueda *et al.*, 2002) y recombinante (Barba Cedillo *et al.*, 2012) de *O. piceae* sobre ésteres de *p*-nitrofenol, glicerol y colesterol. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia del detergente no-iónico Genapol X-100

Sustrato	Longitud de cadena e insaturaciones	Parámetros catalíticos	OPE	OPE*
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	C4:0	K_m^{ap}	0,27±0,03	2,33±0,19
		k_{cat}^{ap}	44±2	2.533±55
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	162±13	1.089±70
Palmitato de <i>p</i> -nitrofenilo	C16:0	K_m^{ap}	0,33±0,03	0,37±0,03
		k_{cat}^{ap}	74±3	1.049±28
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	224±12	2.875±212
Tributirato de glicerilo	C4:0	K_m^{ap}	9,90±0,80	5,10±0,30
		k_{cat}^{ap}	179±4	1.041±14
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	18±1	204±10
Trioleato de glicerilo	C18:0	K_m^{ap}	0,98±0,08	0,71±0,09
		k_{cat}^{ap}	290±7	1.362±41
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	296±18	1.924±197
Butirato de colesterilo	C4:0	K_m^{ap}	3,00±0,50	1,60±0,20
		k_{cat}^{ap}	47±2	212±7
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	15,6±1,8	133±13
Oleato de colesterilo	C18:1	K_m^{ap}	1,00±0,10	0,69±0,10
		k_{cat}^{ap}	138±4	631±21
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	138±9	918±108
Linoleato de colesterilo	C18:2	K_m^{ap}	0,99±0,06	0,71±0,09
		k_{cat}^{ap}	150±3	798±25
		k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}	152±6	1.132±123

K_m^{ap} (mM), k_{cat}^{ap} (s⁻¹) y k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} (mM⁻¹s⁻¹). Los errores estándar están basados en el ajuste de los datos usando SigmaPlot 11.0. Los errores de k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} se obtuvieron ajustando la ecuación de Michaelis-Menten como $V=(k_{cat}^{ap}/K_m^{ap})[S]/(1+[S]/K_m^{ap})$.

-Resultados-

3.3.4. Características espectroscópicas: dicroísmo circular UV

La estructura secundaria de ambas enzimas se analizó mediante espectroscopía de dicroísmo circular con el fin de encontrar diferencias entre ellas que pudiesen explicar los resultados cinéticos. Sin embargo, sus espectros fueron similares, con las dos bandas típicas negativas a 222 y 209 nm característica de α -hélice (**figura 3.13**). El análisis de los espectros por el método k2D de DichroWeb (Lobley *et al.*, 2002) resultó en un contenido idéntico de α -hélice (0,46), lámina- β (0,23), y espiral aleatoria (0,31) para las dos proteínas (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

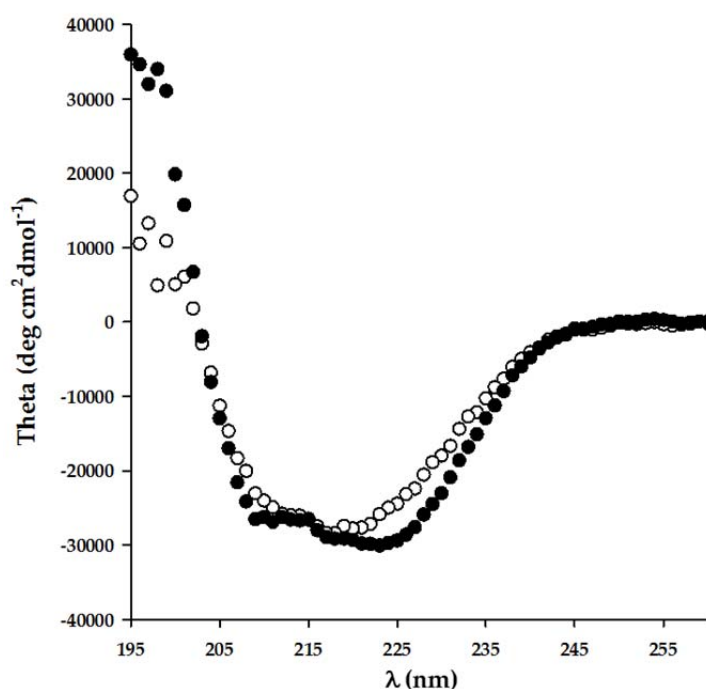


Figura 3.13. Espectroscopía de Dicroísmo Circular. Espectros de las enzimas nativa (○) y recombinante (●) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

3.3.5. Estudio de modificaciones postraduccionales en la proteína recombinante

3.3.5.1. N-glicosilación

El mayor grado de glicosilación presente en la proteína recombinante (28% frente al 8% de la proteína nativa) podría contribuir a mejorar sus propiedades catalíticas. La enzima recombinante tiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación que se muestran en el siguiente modelo (**figura 3.14**): AsnSerSer, AsnIleThr y AsnAlaThr; que corresponden con las asparaginas Asn110, Asn350 y Asn368, respectivamente.

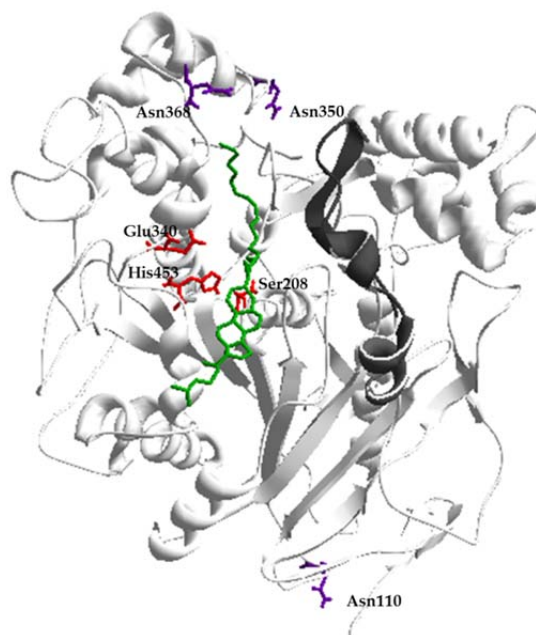
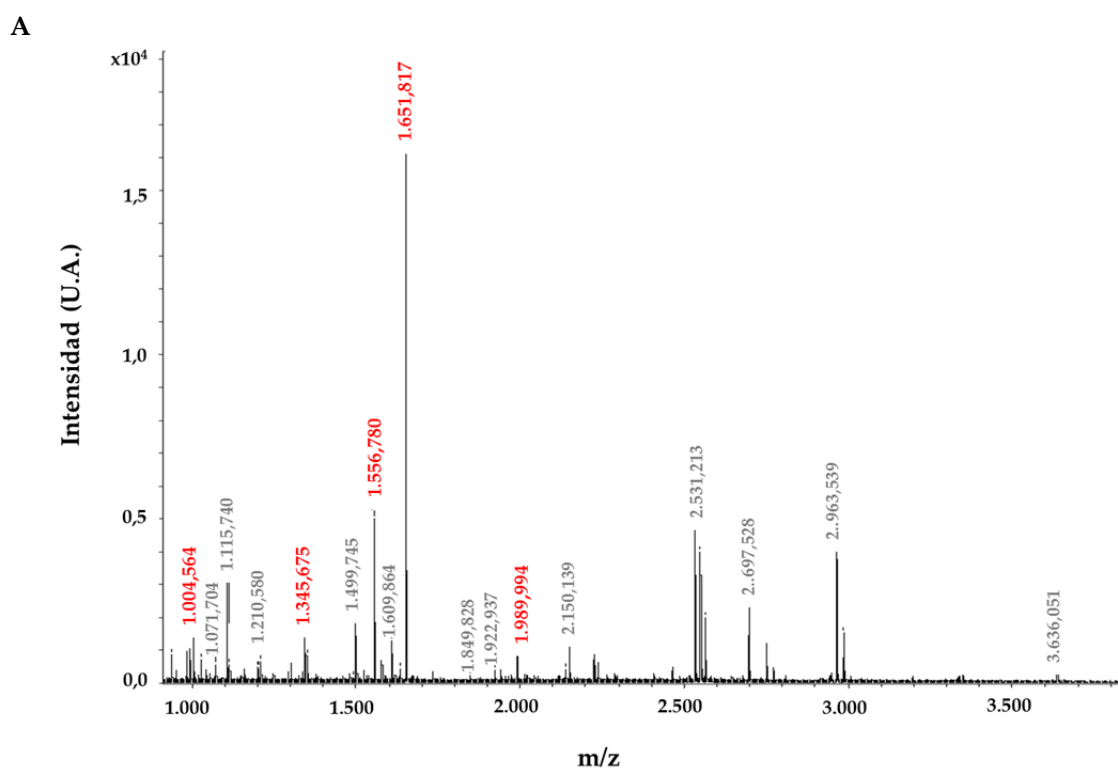


Figura 3.14. Sitios potenciales de N-glicosilación en el modelo de la esterasa recombinante. Se muestran las posiciones de los tres residuos de asparagina (en violeta) potencialmente susceptibles de ser N-glicosilados. Modelo generado con *spdbviewer*. El pdb del complejo enzima-linoleato de colesterol se obtuvo a partir del programa de modelado I-TASSER

3.3.5.1.1. Estudio por espectrometría de masas

El estudio por MALDI-TOF/TOF permitió confirmar la huella peptídica de la proteína; sin embargo, ninguno de los 10 péptidos tripticos obtenidos y analizados contuvieron las secuencias de N-glicosilación por lo que no se pudieron confirmar los puntos exactos glicosilados en la proteína (**figura 3.15**). Posiblemente los péptidos que contenían dichas secuencias fueron más grandes de lo deseado y reunieron características que impidieron que fueran resueltos por esta técnica.



-Resultados-

B

```

1  MPKRRDQSIE PRITTVNVNYP EGEVVGVSVL GIESFRGVVF AQPVGNLRL
51  KPPVRYTENI GTKDITGIGP SCPQMYLSTG NGELLFQLVG NLINIPLFQT
101 ATLSSDCLT LNIQRPAGTT SNSSLPVLFW IFGGGFELGT NQYYDGIDLL
151 TEGISLGEPE IFVAINYRVG GFGFLGGKEI KADGSSNLGL LDQRIALEWV
201 ADNIASFGGD PSKVTIWGES AGSISVFDQM ALYGNNKYK GKALFRGGIM
251 NSGSVVPAAE VDGVAQAIIY DHVVSEAGCA GTSDTLACLR TVDYTKFLTA
301 VNSVPGIVSY SSIALSYLPR PDGVVLIDSP EEIVKNKQYA AVPMIIGDQE
351 DEGTFAVLP NNITSTAKIV QYFQDLYFYN ATKEQLTAFV NTYPTDITAG
401 SPFNTGIFNE LYPGFKRLAA ILGDMTFTLA RRAFLQLCSE VNPDPVPSWY
451 LASYDYGFPF LGTFHATDIL QVFGVLPNY ASGSIQKYYI NEVTTGDPNK
501 GAAVDIQWPO WSAKNILQI YATKAVIVAD NFRAKSYEYL YNNIGIFRI

```

Figura 3.15. Huella peptídica de la enzima recombinante. Espectro obtenido por MALDI-TOF/TOF (A). En rojo se indican los péptidos que han encontrado correspondencia en la secuencia de la proteína nativa. Secuencia donde se indican recuadrados dichos péptidos (B). Éstos cubren un 23% de la secuencia proteica. Obsérvese que ninguno de ellos presenta los sitios potenciales de N-glicosilación que se han subrayado en rojo.

3.3.5.1.2. Efecto de la desglicosilación en la actividad de las enzimas nativa y recombinante

Ambas esterases muestran la misma M_r después de su desglicosilación en condiciones no desnaturalizantes con Endo H. Sin embargo, no mostraron diferencias significativas en sus actividades frente a *p*NPB, trioleína, y oleato de colesterilo antes y después de la desglicosilación (figura 3.16) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

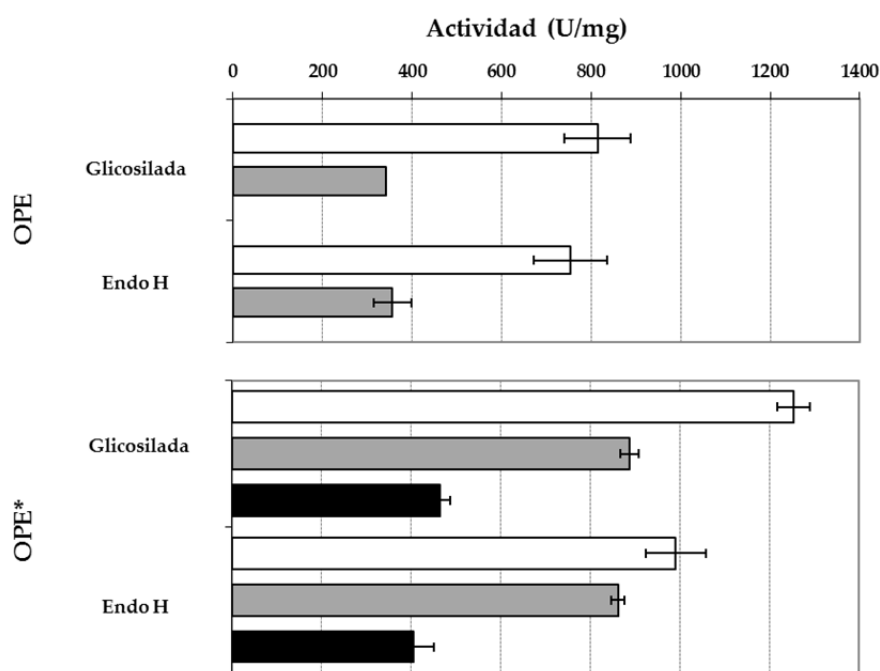


Figura 3.16. Actividad de las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae* antes y después del tratamiento con Endo H. Se ensayaron distintos sustratos para el análisis: *p*NPB (□), trioleína (■) y oleato de colesterilo (■). Los sustratos se utilizaron a una concentración de 5 mM en presencia de Genapol X-100. Las condiciones se describen en la sección de materiales y métodos. Los puntos de datos son la media de al menos dos medidas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

3.3.5.2. Oxidación de metioninas

La oxidación en los residuos de metionina ha sido descrita previamente en *P. pastoris* (Barral *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2003) y podría ser un nuevo factor a tener en cuenta para explicar las propiedades catalíticas mejoradas de la enzima recombinante. En la **figura 3.17** se muestra un modelo de la enzima donde se pueden visualizar las cinco metioninas que pueden ser potencialmente oxidadas.

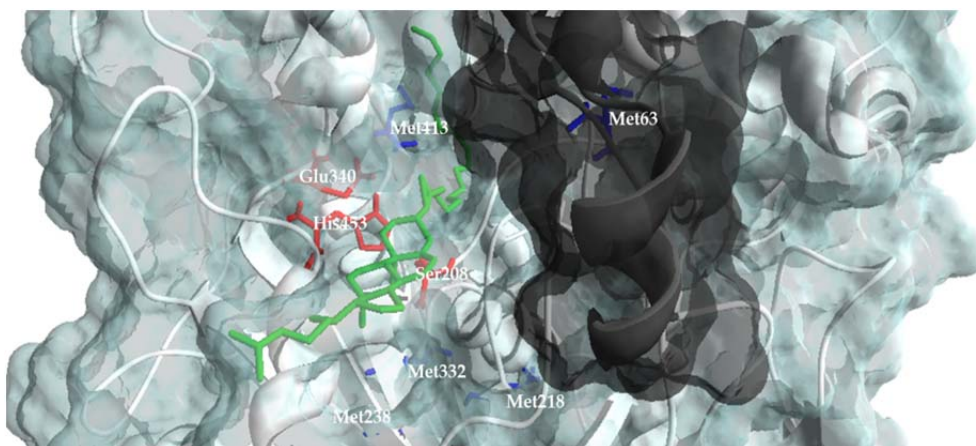


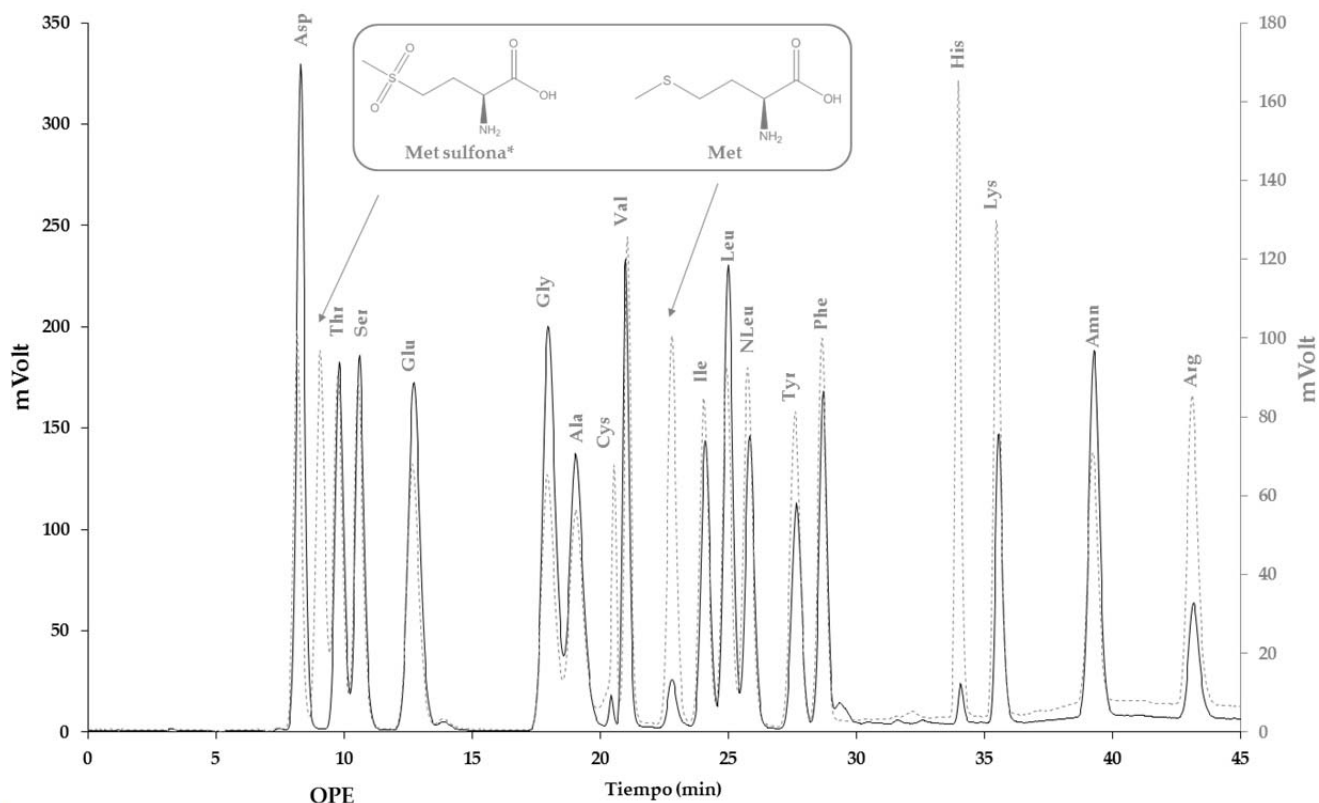
Figura 3.17. Residuos de metioninas en OPE*. Se muestra el detalle del sitio de reconocimiento y unión al sustrato de la enzima recombinante donde se indican las posiciones de las metioninas que pueden ser oxidadas (representadas en color azul), los residuos de la triada catalítica (en rojo) y el linoleato de colesterol (en verde). Los residuos de la hipotética tapadera se representan en negro. Modelo generado con *spdbviewer*. El pdb del complejo enzima-linoleato de colesterol se obtuvo a partir del programa de modelado I-TASSER.

El análisis de aminoácidos de ambas proteínas reveló la falta de metionina sulfona, la forma oxidada de la metionina, en la esterase recombinante (**figura 3.18A**) (Barba Cedillo *et al.*, 2012). Además, este análisis reveló diferencias en la composición de aminoácidos de las enzimas nativa y recombinante (**figura 3.18B**); lo cual se pudo atribuir al mayor grado de contaminación por péptidos en la enzima nativa antes de realizar un paso adicional de purificación por cromatografía de fase reversa (**figura 3.19A**).

En paralelo a estos análisis también se llevaron a cabo experimentos de oxidación de la enzima nativa con el fin de corroborar si una posible modificación en residuos de metionina podría suponer un aumento en su actividad. Para ello se incubó la enzima cruda con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, como agente oxidante, a distintos tiempos y a temperatura ambiente (**figura 3.20A**). Los resultados mostraron, que en las condiciones ensayadas, la enzima apenas presentaba una modificación de su actividad con respecto al control sin tratar. Es más, cuando las condiciones de oxidación se forzaron realizando la incubación de la proteína a 60 °C durante una hora (**figura 3.20B**) tampoco se vieron variaciones en la actividad (salvo las propias del efecto de la temperatura); ni siquiera al aumentar el tiempo a 4h, por lo que, a priori, no parecía que la enzima se oxidase fácilmente.

-Resultados-

A



B

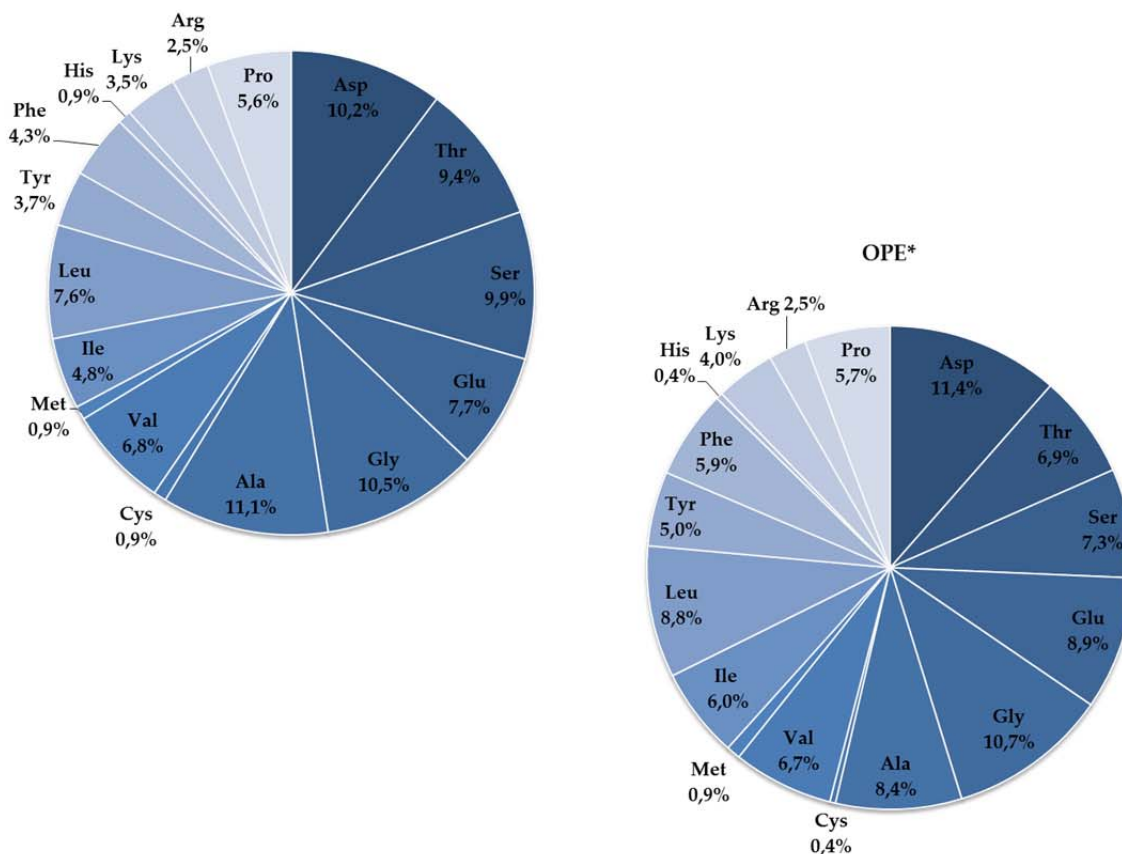
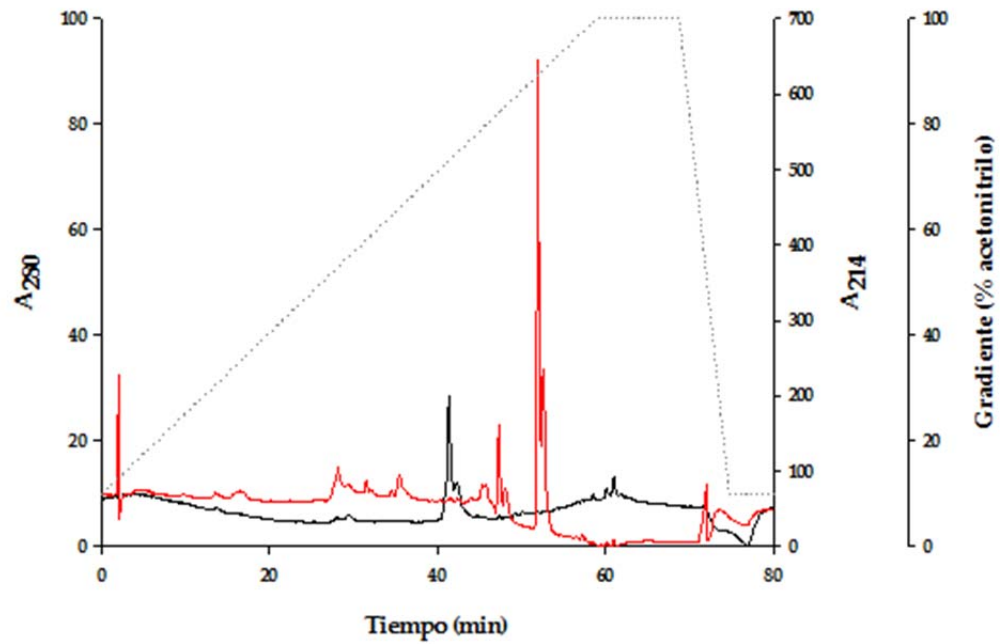


Figura 3.18. Análisis de aminoácidos de la proteína nativa y recombinante. Determinación de residuos de metionina oxidada (A). Se muestran los cromatogramas obtenidos de una muestra estándar hidrolizada donde se añadió metionina sulfona (-----) y de una muestra de enzima recombinante hidrolizada (—). Se detallan las fórmulas estructurales de la metionina y de la metionina sulfona (Barba Cedillo *et al.*, 2012). Composición de aminoácidos de ambas enzimas (B).

A



B

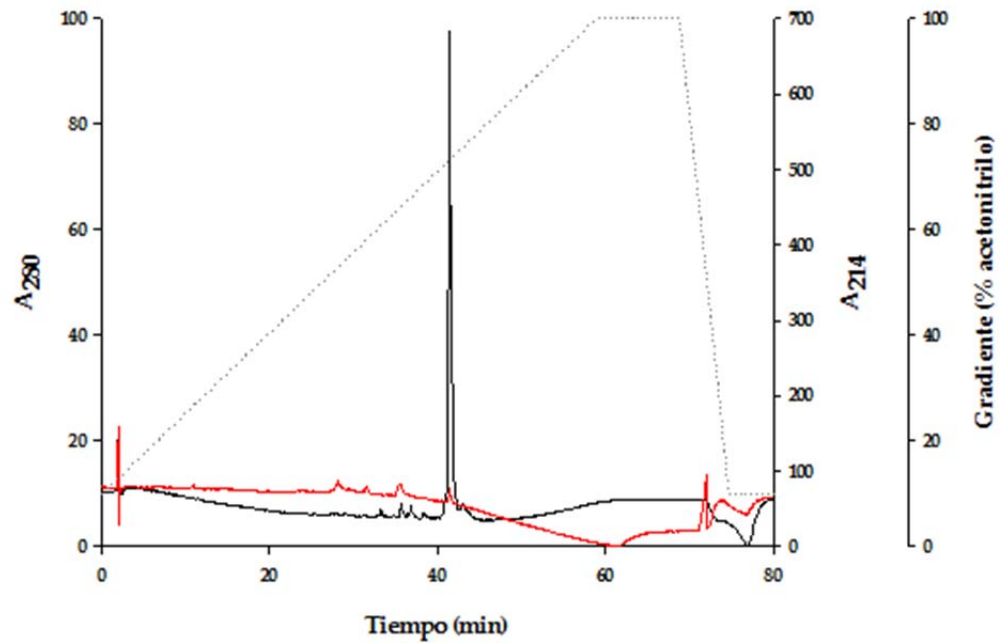


Figura 3.19. Perfiles de purificación de las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae* por cromatografía de fase reversa. OPE (A) y OPE* (B). La proteína eluyó a los 42,5 minutos tras alcanzarse un 75% de acetonitrilo con trifluoroacético al 0,1%. A₂₈₀ (—), A₂₁₄ (—) y gradiente (.....).

-Resultados-

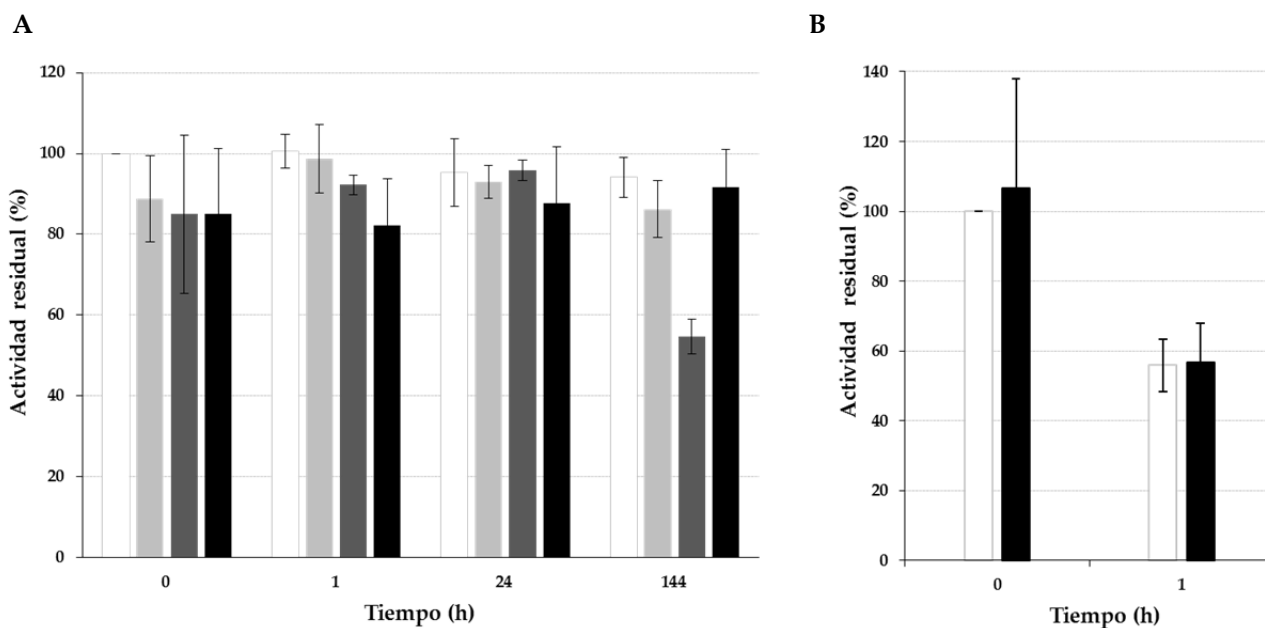


Figura 3.20. Oxidación de la enzima nativa. Oxidación con H_2O_2 a distintas concentraciones a temperatura ambiente (A): 0 mM (□), 50 mM (■), 100 mM (■) y 200 mM (■). Oxidación con H_2O_2 a distintas concentraciones a 60 °C (B): 0 mM (□) y 200 mM (■). El experimento se realizó por duplicado, los valores experimentales representan las medias de los datos obtenidos y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

3.3.6. Secuenciación del extremo N-terminal de la proteína recombinante

En la enzima recombinante se encontró una secuencia N-terminal modificada (EAEAYVEFTVNVNYPE) comparada con la de la nativa (TVNVNYPE). Este hecho se puede explicar debido a la estrategia del proceso de clonación, que añadió 4 residuos de aminoácidos (YVEF) pertenecientes a los sitios de reconocimiento de la *EcoRI* (gaattc) y *SnaBI* (tacgta) en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pPIC9. Por otro lado, el procesamiento incorrecto del pre-propéptido del factor α de *S. cerevisiae* por la proteasa STE13 añadió dos (EA) o cuatro (EAEA) residuos más a la secuencia. Entonces, la secuencia N-terminal de la OPE* contenía 6 u 8 residuos adicionales, coexistiendo ambas formas en la proteína recombinante purificada (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

3.3.7. Estudios sobre la agregación en las enzimas nativa y recombinante

El estado de agregación de ambas proteínas se estudió mediante técnicas de ultracentrifugación analítica, que comprendieron estudios de velocidad y de equilibrio de sedimentación.

En cuanto al método de la velocidad de sedimentación, la proteína nativa mostró en solución acuosa (25 mM de tampón fosfato de sodio pH 7,0) un alto coeficiente de sedimentación (**figura 3.21A**), que correspondía a un agregado de elevada masa molecular. Sin embargo, en las mismas condiciones, la proteína recombinante presentó coeficientes de sedimentación de 4,6S y 7,2S para la forma monomérica y dimerica, respectivamente (**figura 3.21C**). Cuando se realizó el estudio en presencia de Genapol X-100 al 1% (v/v), ambas proteínas mostraron coeficientes de sedimentación de 3,3S y 3,8S, compatibles con las formas monoméricas de la proteína nativa y recombinante, respectivamente (**figuras 3.21B y 3.21D**). Estos coeficientes difirieron con los medidos en solución acuosa porque el detergente afectó a la flotabilidad de las proteínas. Se llevó a cabo un experimento adicional, en solución acuosa, con la OPE* desglucosilada obtenida después del tratamiento con Endo H en condiciones no desnaturizantes. En este caso, la proteína también se encontró como una mezcla de formas monomérica y dimerica, con coeficientes de sedimentación de 4.2S y 6.7S (**figura 3.21E**). La presencia de tensioactivo permitió obtener la forma

monomérica con un coeficiente de sedimentación de 3,2S (figura 3.21F). Estos coeficientes fueron ligeramente más bajos que los obtenidos para la proteína glicosilada, debido a la falta del N-glicano unido a los residuos de asparagina. (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

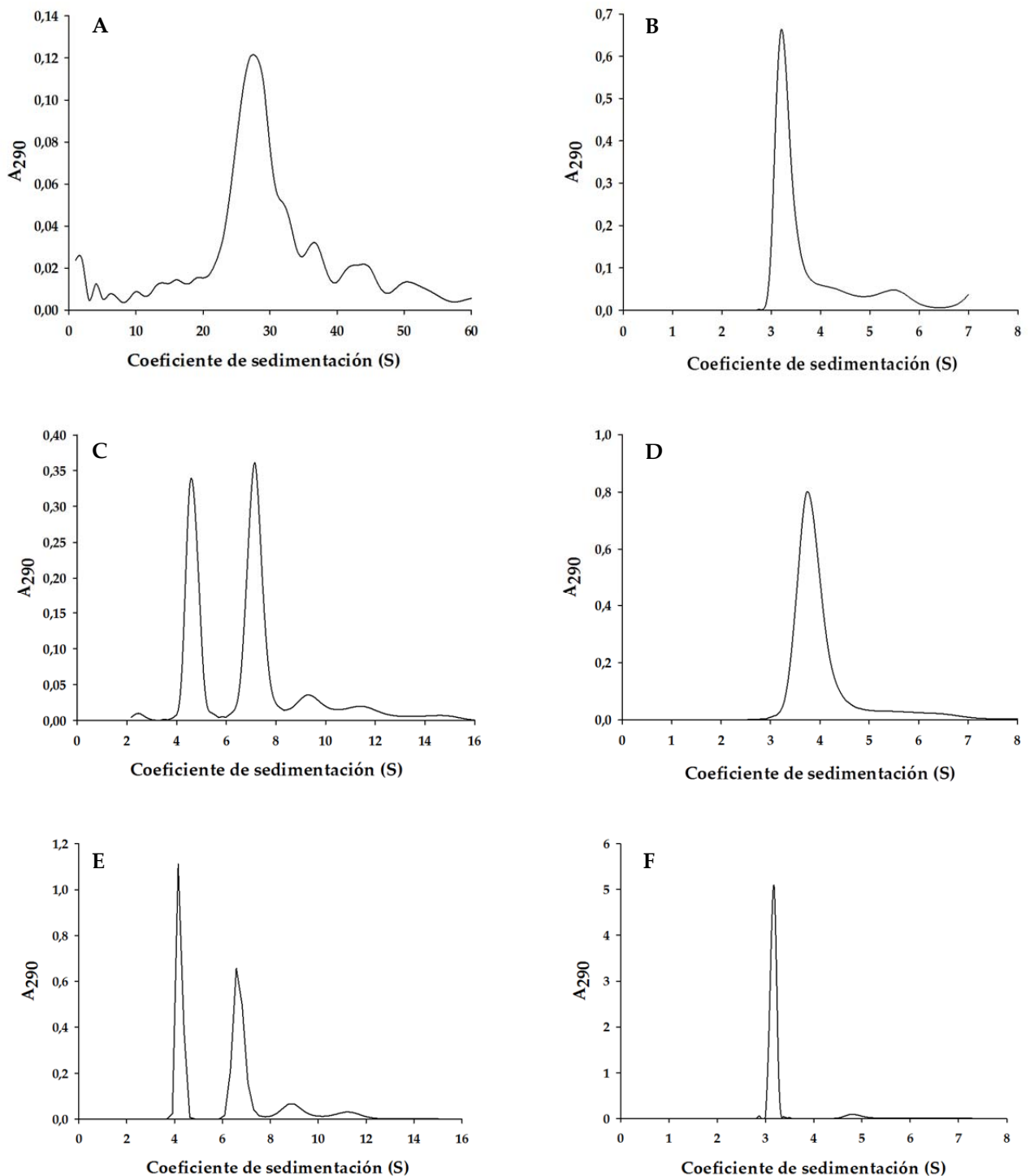


Figura 3.21. Velocidades de sedimentación de la esterase nativa y recombinante. En solución acuosa (A y B, respectivamente) y en presencia de Genapol X-100 (C y D, respectivamente). En solución acuosa (E) y en presencia del tensioactivo (F) de la enzima recombinante tratada con Endo H. Las condiciones se describen en la sección experimental (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

-Resultados-

Los experimentos de equilibrio de sedimentación para la OPE* en solución acuosa corroboraron una masa molecular promedio de 138 kDa (v -bar teórico 0,73, siendo v -bar el volumen específico parcial) que es compatible con el dímero (**figura 3.22A**). La tendencia a formar grandes agregados de OPE impidió este tipo de estudio. Cuando se empleó un agente tensioactivo, las masas moleculares promedio fueron de 45 kDa (v -bar teórico 0,73) y 56 kDa (v -bar teórico 0,73) para OPE (**figura 3.22B**) y OPE* (**figura 3.22A**), respectivamente (inferiores a los esperados debido al Genapol X-100, aunque compatibles con la forma monomérica). En cuanto a la proteína recombinante desglucosilada, se obtuvo una masa molecular media de 109 kDa (v -bar teórico 0,74) en solución acuosa. Esto se pudo explicar por la coexistencia de una mezcla de especies moleculares, en contraste con los 47,5 kDa (v -bar teórico 0,74) obtenidos para esta muestra en presencia de detergente, compatible con la forma monomérica (**figura 3.22C**) (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

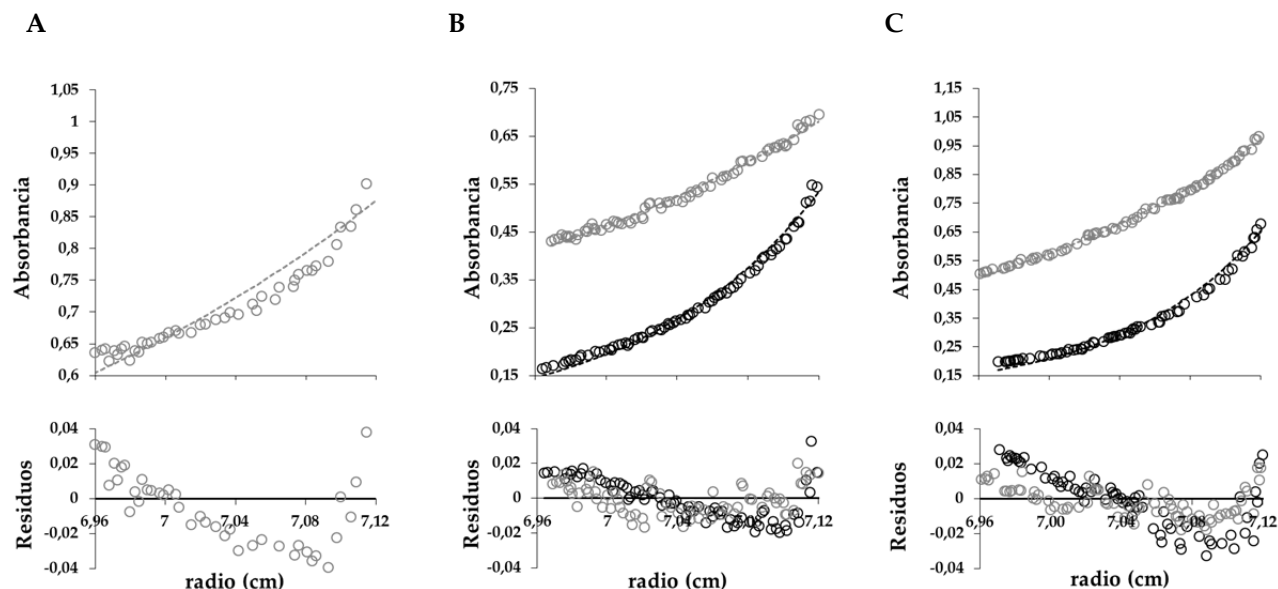


Figura 3.22. Equilibrios de sedimentación. Esterol esterasa nativa (A), recombinante (B) y recombinante tratada con Endo H (C). En solución acuosa (○) y en presencia de Genapol X-100 (○). Las rectas de puntos representan el ajuste de los datos al modelo que mejor describe el estado de agregación en cada caso. Las condiciones se describen en la sección experimental.

3.4. ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

3.4.1. Selección de transformantes His⁺Mut^s

Se analizaron diferentes transformantes Mut^s en medio mínimo y tamponado BMM con o sin sorbitol. Debido al fondo genético de esta cepa, las células no crecieron en ausencia de sorbitol (**figura 3.23A**) pero su presencia favoreció su proliferación (**figura 3.23B**). La producción de enzima con los distintos transformantes en relación con la biomasa generada se situó en niveles en torno a las 175 U/g después de 96 h de incubación; y dicha productividad fue de alrededor de 1,2 veces mayor cuando el medio fue suplementado con sorbitol (**figura 3.23C**). El mejor transformante, en términos de producción de esterol esterasa en el medio suplementado, la colonia B, fue seleccionado para los bioprocesos (Barba Cedillo *et al.*, 2014). El transformante Mut⁺ seleccionado previamente (**sección 3.2.1**) fue también empleado.

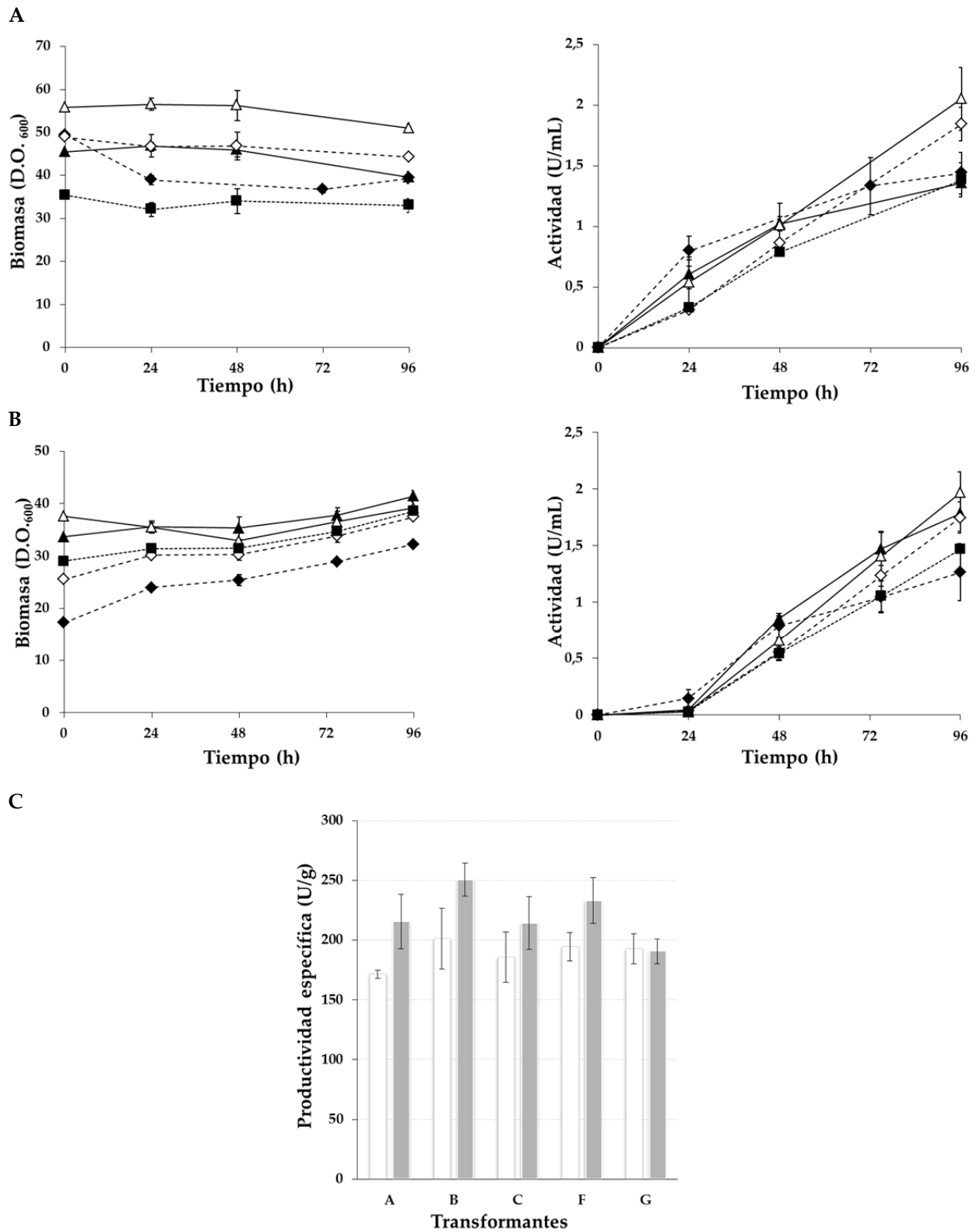


Figura 3.23. Selección de transformantes Mut^s en medio BMM. Biomasa generada y actividad *vs* pNPB en ausencia (A) y presencia (B) de sorbitol. Transformante A (▲), transformante B (△), transformante C (◆), transformante F (◇) y transformante G (■). Productividad específica en ausencia (□) y presencia (■) de sorbitol (C). El experimento se realizó por triplicado. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar de los valores experimentales obtenidos.

-Resultados-

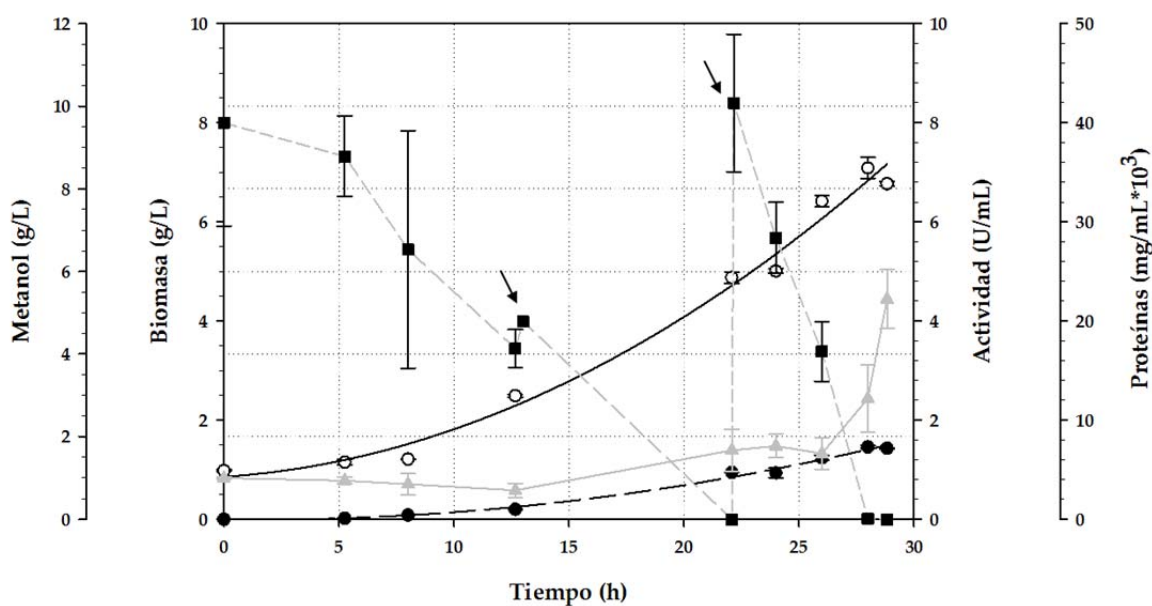
3.4.2. Procesos operando en discontinuo

La evolución de las principales variables del proceso para ambos fenotipos en medio YNB se presenta en la **figura 3.24**. En el caso de la cepa con fenotipo Mut⁺, una vez que el metanol inicial fue consumido, se añadieron dos pulsos más de éste tras 13 horas (para aumentar la concentración en 1g/L) y 22 horas (alcanzando 10g/L) (**figura 3.24A**). Los niveles de enzima extracelular después de 29 h utilizando metanol como única fuente de carbono fueron 1,4 U/mL (**tabla 3.6**). En contraste, con la cepa de fenotipo Mut^s en presencia de alrededor de 10 g/L de metanol y sorbitol, se obtuvieron 7,9 U/mL de enzima al final del proceso (**figura 3.24B**), un valor 5,6 veces mayor que con la Mut⁺ (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

Aunque la cepa Mut⁺ mostró una mayor tasa de crecimiento específico que la cepa Mut^s, los valores de $Y_{P/X}$, productividad volumétrica y específica fueron mucho más altos para la Mut^s: 3,9, 3,4 y 2,4 veces mayores respectivamente (**tabla 3.5**) (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

No se observó proteólisis en ninguno de los bioprocesos. Sin embargo, al final del cultivo con la cepa Mut⁺ se detectó un aumento importante de los niveles de proteína total, este fenómeno no se observó en el fenotipo Mut^s. Antes de que éstos aumentaran repentinamente, la relación entre unidades de actividad y mg de proteína total fue muy similar para ambos fenotipos a lo largo del cultivo (alrededor de 0,17 U/g) (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

A



B

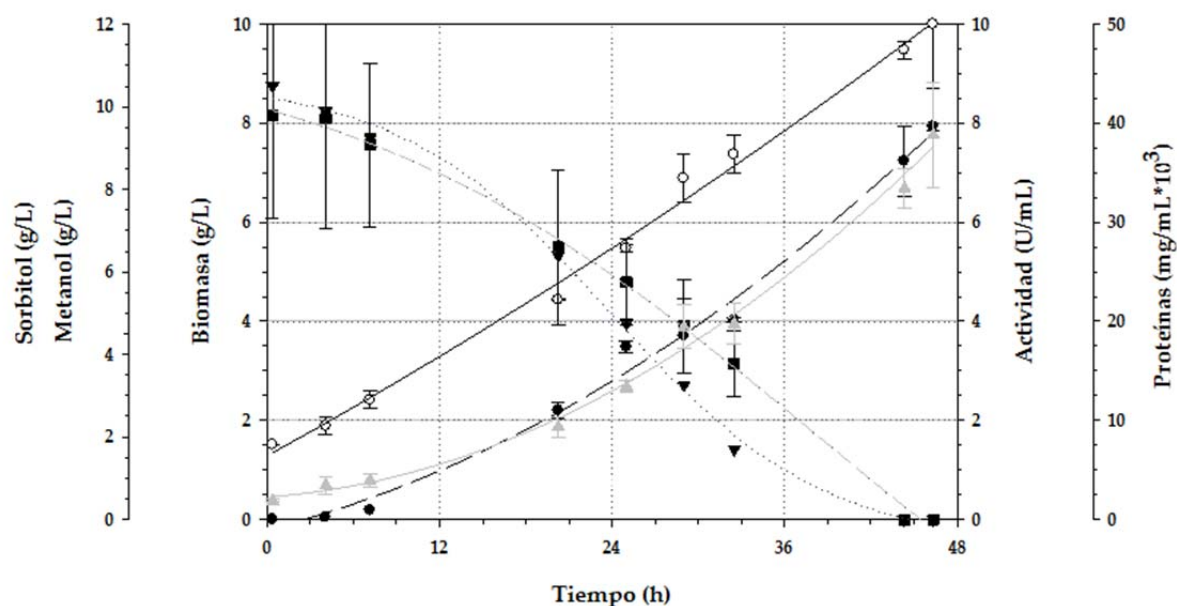


Figura 3.24. Bioproceso en discontinuo en medio YNB. Cepa Mut⁺ (A) y Mut⁻ (B) expresando OPE*. Evolución con el tiempo de la actividad vs pNPB (●), la biomasa (○), la proteína total (▲), las concentraciones de metanol (■) y sorbitol (▼). Las flechas indican la adición de metanol al cultivo de la cepa Mut⁺. Los datos representados son las medias de los datos experimentales y se han ajustado estadísticamente utilizando el software SigmaPlot 11.0. Las barras de error corresponden a la desviación estándar para las mediciones (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

Tabla 3.5. Comparación de los parámetros de proceso de diferentes fenotipos de *P. pastoris* expresando OPE* bajo el control de P_{AOX1} en cultivos en discontinuo en biorreactor (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

	Mut ⁺ medio YNB	Mut ⁻ medio YNB
Actividad máxima (U/mL)	1,4	7,9
Y _{X/S} (gX/gsustrato)	0,27	-
Y _{P/X} (U/gX)*	238,6	934,9
Productividad volumétrica (U/L·h)*	52,00	175,5
Productividad específica (U/gX·h)*	8,5	20,8
μ _{max} (h ⁻¹)	0,09	0,03

*Estos parámetros se calcularon en base a la máxima actividad

3.4.3. Procesos operando en discontinuo alimentado

Una vez que se determinó el rendimiento en cultivos discontinuos, se implementó una estrategia de producción en bioprocesos en discontinuo alimentado para ambos fenotipos.

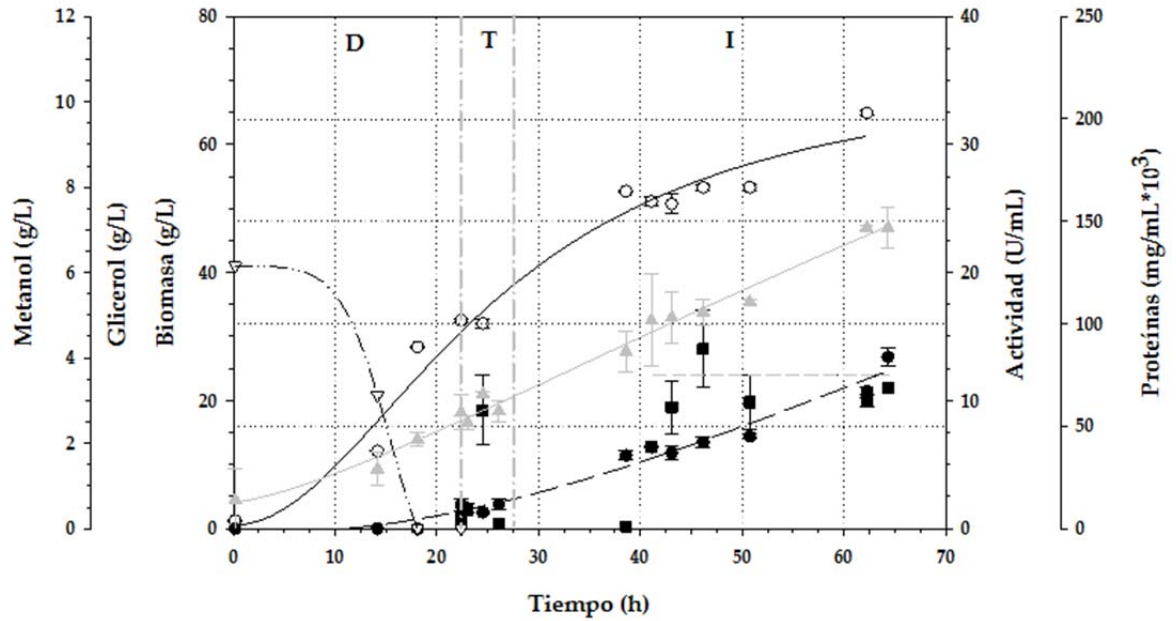
Tras las fases previas de crecimiento y transición, se inició la fase en discontinuo alimentado, que para el fenotipo Mut⁺ se llevó a cabo utilizando metanol como única fuente de carbono y energía. Las primeras 10 horas de inducción fueron en condiciones de metanol limitado con el fin de obtener una fácil adaptación de la levadura al substrato inductor. Después de esto, mediante un control predictivo-PI, se marcó una concentración de metanol de 3,0 g/L. La **figura 3.25A** muestra la evolución de la biomasa, la actividad enzimática, la proteína total, las concentraciones de glicerol y de metanol durante el bioproceso. Una vez que el control se activó (40 horas) la concentración de metanol se mantuvo alrededor del punto de ajuste y la tasa de crecimiento específico alcanzó un valor constante de 0,035 h⁻¹, este valor fue unas 2,6 veces menor que la μ_{\max} observada en el bioproceso en discontinuo, aunque $Y_{P/X}$ fue bastante similar, la actividad máxima obtenida con el uso de dicha estrategia se incrementó 9,6 veces y la productividad volumétrica fue 4 veces mayor en comparación con el bioproceso en discontinuo (**tabla 3.6**). El nivel máximo de biomasa fue de 64,9 g/L después de 60 h. En este punto, trabajar a una velocidad de aireación con oxígeno puro de 0,5 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) y una velocidad de agitación de 1000 rpm no fue suficiente para mantener los valores de oxígeno disuelto superiores al 20% y el bioproceso se detuvo. En comparación con el proceso en discontinuo, el perfil de la proteína extracelular total fue similar al del crecimiento y la producción de OPE*, no se observó un aumento repentino de los niveles de proteína total a lo largo del cultivo. Sin embargo, la relación entre unidades de actividad y miligramos de proteína total fue dos veces inferior (alrededor de 0,089 U/g) lo que podría estar indicando una alta producción de proteínas endógenas de *P. pastoris* (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

Debido a los problemas observados con la cepa Mut⁺, alto consumo de oxígeno y generación de calor, y por los excelentes resultados obtenidos en el proceso en discontinuo, la cepa Mut^s fue crecida en un bioproceso en discontinuo alimentado usando una estrategia de co-adición de sorbitol.

Esta estrategia se realizó empleando metanol a una concentración de 2,5 g/L con un algoritmo de control similar que en el fenotipo Mut⁺ y una velocidad pre-programada de adición exponencial de sorbitol para llegar a una tasa de crecimiento específico de 0,02 h⁻¹. La **figura 3.25B** muestra la evolución de los variables del proceso. No se observaron problemas de temperatura con el fenotipo Mut^s aunque fue necesario complementar el aire con oxígeno, aunque los niveles de oxígeno disuelto fueron siempre mayores del 20% a lo largo del bioproceso. La tasa de adición exponencial de sorbitol preprogramada estuvo bien implementada debido a que la tasa media de crecimiento específico alcanzado a lo largo del proceso biotecnológico (0,018 h⁻¹) fue un poco más baja que la marcada (0,02 h⁻¹). La cantidad de sorbitol residual en el medio de cultivo fue menor de 1 g/L y no afectó a la producción de la proteína recombinante ni al crecimiento celular. La concentración de metanol se mantuvo siempre por debajo del punto de ajuste de 2,5 g/L, con oscilaciones inferiores a 0,6 g/L, mostrando el buen desempeño del algoritmo de control implementado debido a la menor tasa de consumo de metanol de la cepa Mut^s. Con todo esto, al final del bioproceso, se obtuvieron 29,4 U/ml de actividad enzimática, 3,7 veces mayor que los resultados del bioproceso en discontinuo. También la productividad volumétrica fue 2,3 veces superior. Sin embargo, $Y_{P/X}$ y la productividad específica fueron 2,2 y 3,7 veces menor, probablemente por la naturaleza sintética del medio (**tabla 3.7**) (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

Aunque la tasa específica de crecimiento fue menor para el fenotipo Mut^s, la actividad máxima, $Y_{P/X}$, y las productividades volumétrica y específica fueron mayores que con Mut⁺ (**tabla 3.6**) (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

A



B

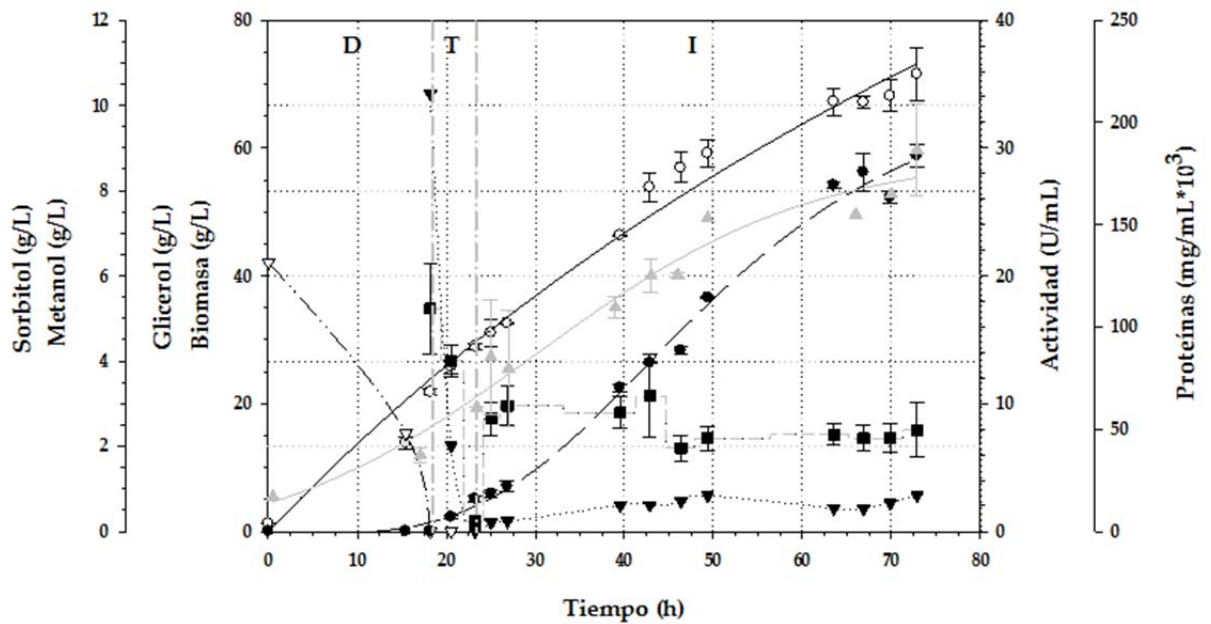


Figura 3.25. Bioprocesos en discontinuo alimentado en medio MBS. Cepa *Mut⁺* (A) y *Mut⁻* (B) expresando OPE*. Evolución con el tiempo de la actividad *vs* pNPB (●), la biomasa (○), la proteína total (▲), las concentraciones de glicerol (▽), metanol (■) y sorbitol (▼). Fase de crecimiento en glicerol (D), fase de transición (T), y fase de discontinuo alimentado-inducción (I). Los datos experimentales se ajustaron estadísticamente utilizando SigmaPlot 11.0. Las barras de error corresponden a la desviación estándar para estas mediciones (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

-Resultados-

Tabla 3.6. Comparación de los parámetros de proceso de distintos fenotipos de *P. pastoris* expresando OPE* bajo el control de P_{AOXI} en cultivos en discontinuo alimentado a concentraciones marcadas de metanol de 3 y 2,5 g/L para Mut⁺ y Mut^s, respectivamente. Con la cepa Mut^s se usó sorbitol como co-sustrato durante las fases de transición e inducción (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

	Mut ⁺ medio BSM	Mut ^s medio BSM
Actividad máxima (U/mL)	13,40	29,40
$Y_{P/X}$ (U/gX)	206,40	410,80
Productividad volumétrica (U/L·h)	208,20	403,50
Productividad específica (U/gX·h)	3,20	5,60
μ_{media} (h ⁻¹)	0,035	0,018

Muestras del líquido de cultivo obtenidas al final de ambas fermentaciones fueron concentradas y analizadas por SDS-PAGE (**figura 3.26**). El perfil de proteínas fue el mismo para ambas cepas siendo OPE* una de las enzimas mayoritarias secretadas por la levadura (alrededor del 25 y 55% de la muestra de Mut⁺ y Mut^s, respectivamente, según el análisis de gel por densitometría). Por lo tanto, Mut^s produce dos veces más OPE* que Mut⁺. Esta relación está de acuerdo con el nivel de actividad logrado mostrado en la **tabla 3.6**. Se pudo estimar un contenido total de proteína pura en los crudos concentrados procedentes de procesos en discontinuo alimentados de 177 mg y 319 para Mut⁺ y Mut^s, respectivamente (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

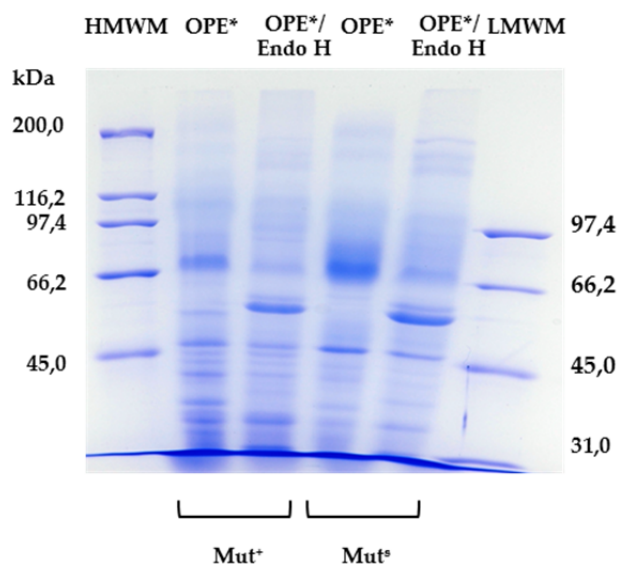


Figura 3.26. Análisis de proteínas por SDS-PAGE después del procesamiento de los crudos. En cada carril se cargaron 30 µg de muestras dializadas obtenidas después del procesamiento de los crudos (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

-Esterasa versátil-

En una comparación entre los niveles de actividad alcanzados en Erlenmeyer, bioprocesos discontinuos y discontinuos alimentados, claramente se pudo apreciar un aumento progresivo de actividad total a medida que se ensayaron las distintas estrategias (**figura 3.27A**) y que las condiciones no controladas de cultivo en Erlenmeyers influyó negativamente en la proporción $Y_{P/X}$ (**figura 3.27B**). No se observaron diferencias al comparar el $Y_{P/X}$ obtenido en los bioprocesos en discontinuo y discontinuo alimentado para Mut^+ , aunque los medios de cultivo fueran diferentes. Sin embargo, para Mut^s , $Y_{P/X}$ en el bioproceso en discontinuo fue mayor que en discontinuo alimentado. Cabe destacar que, en términos de producción total, la estrategia en discontinuo alimentado fue la mejor estrategia operacional (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

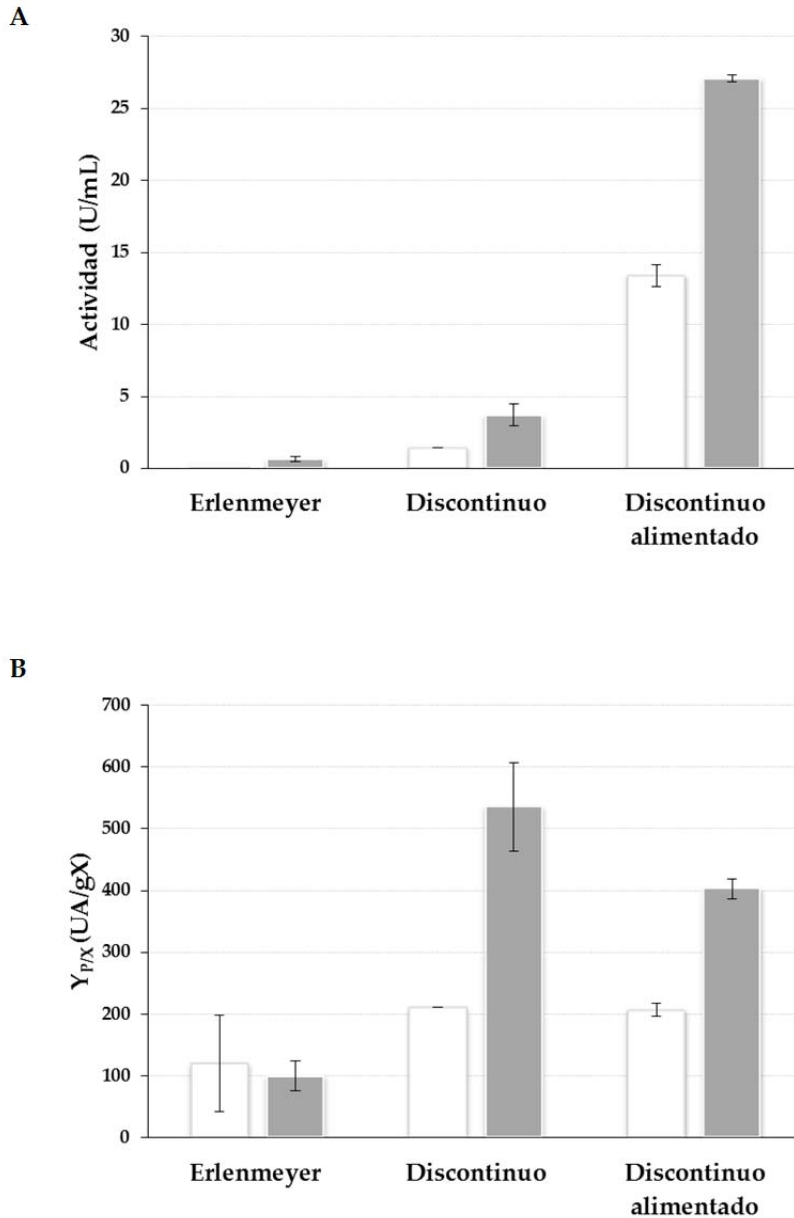


Figura 3.27. Descripción general del escalado de la producción de OPE*. Producción expresada como máxima actividad esterasa *vs* pNPB (A) e $Y_{P/X}$ (B). La comparación se hizo a tiempos de producción y medios de cultivo similares. En todos los casos se usó sorbitol como co-sustrato para la cepa Mut^s . Mut^+ (□); Mut^s (■). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de los valores experimentales (Barba Cedillo *et al.*, 2014).

3.5. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS ENZIMAS NATIVA Y RECOMBIANTE DE *O. piceae*

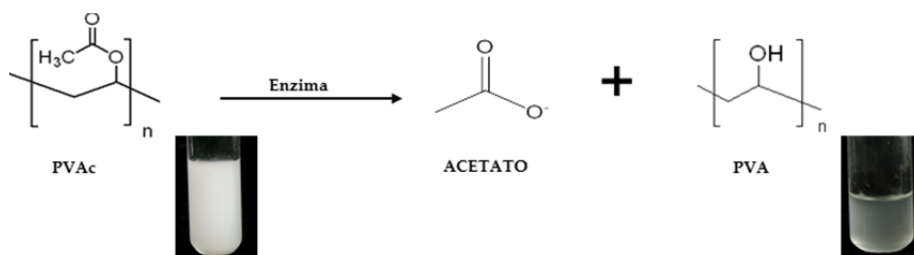
3.5.1. Reducción de los problemas de *stickies* durante la producción de papel reciclado. Desacetilación de PVAc

Un homopolímero lineal de PVAc con un peso molecular de 12.800 se utilizó como sustrato para las enzimas de *O. piceae* y tres enzimas comerciales (Buzyme® 2517, Buzyme® 2518 y Optizyme® 530). La hidrólisis enzimática del polímero consiste en una reacción de desacetilación, dando ácido acético y alcohol polivinílico (PVA). La liberación de ácido acético se siguió por titulación con hidróxido sódico mientras que el PVA se pudo detectar por MALDI-TOF o espectroscopía de FTIR.

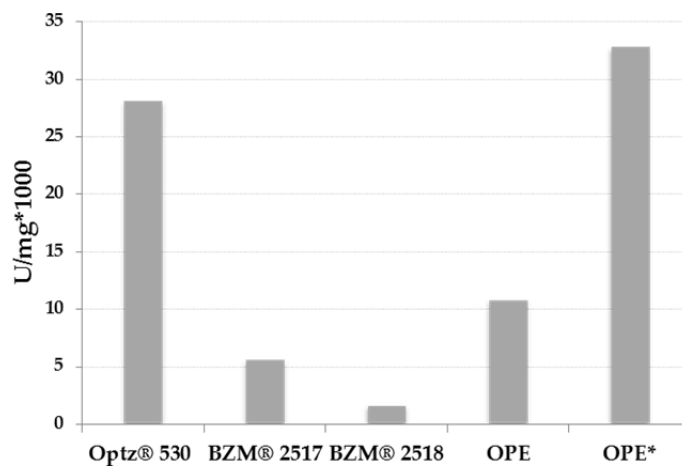
La transformación de PVAc en PVA se observó visualmente como una disminución de la turbidez de la reacción (**figura 3.28A**). Los ensayos de pH-stato mostraron que las enzimas de *O. piceae* y las comerciales fueron capaces de desacetilar PVAc, aunque las reacciones de hidrólisis transcurrieron lentamente bajo las condiciones experimentales utilizadas. Las enzimas de *O. Piceae* y la comercial Optizyme® 530 mostraron los niveles más altos de actividad (aproximadamente 0,03 U/mg), mientras que Buzyme® 2517 y Buzyme® 2518 tuvieron actividades en torno a 5 y 20 veces menos, respectivamente (**figura 3.28B**). Inicialmente, todas las enzimas habían mostrado actividad esterasa bajo condiciones estándar, aunque sólo las enzimas de *O. piceae* y Optizyme® 530 retuvieron su actividad cuando se añadió a la reacción Genapol X-100 al 1% (v/v). Esto podría explicar, en parte, la baja actividad de Buzyme® 2517 y 2518 durante los ensayos de pH-stato en presencia del agente tensioactivo, necesario para mantener el polímero dispersado en agitación (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

Los estudios de MALDI-TOF y espectroscopía FTIR corroboraron la desacetilación del polímero. En el primer caso, los espectros de PVAc antes y después del tratamiento (sin detergente) mostraron la distribución polimérica típica de este tipo de compuestos, con unidades repetidas de 86 Da en muestras no tratadas de PVAc que se transformaron tras del tratamiento enzimático en unidades de repetición de 43 Da en el PVA (**figura 3.28C**). Los análisis de espectroscopía FTIR de las muestras tratadas enzimáticamente mostró la disminución de las bandas de absorción alrededor de 1.250, 1.460 y 1.740 cm^{-1} , característica de la unión éster, mientras que una nueva banda, atribuida al grupo hidroxilo del PVA, apareció alrededor de 3.350 cm^{-1} (**figura 3.28D**) (Barba Cedillo *et al.*, 2013).

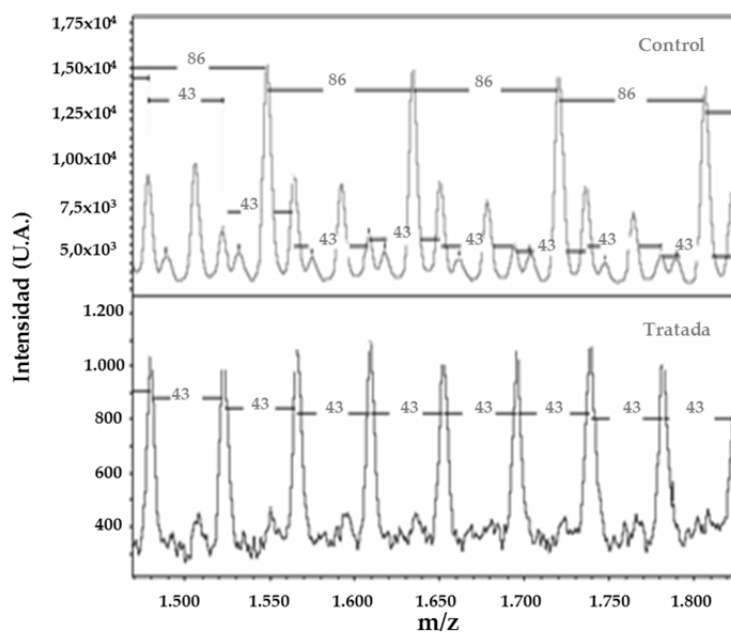
A



B



C



D

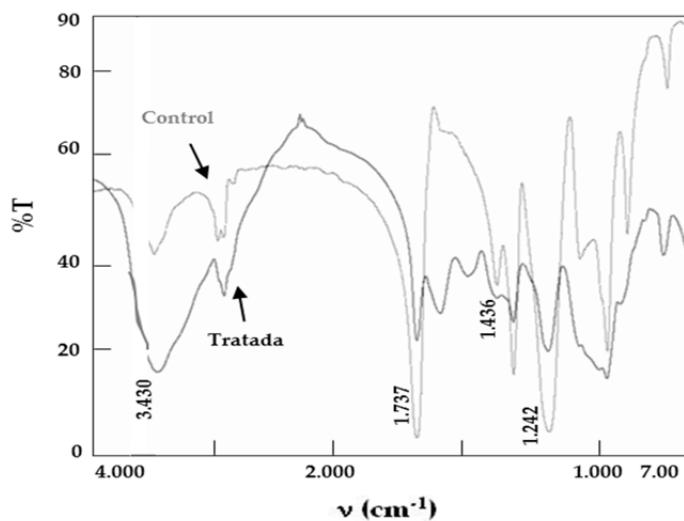


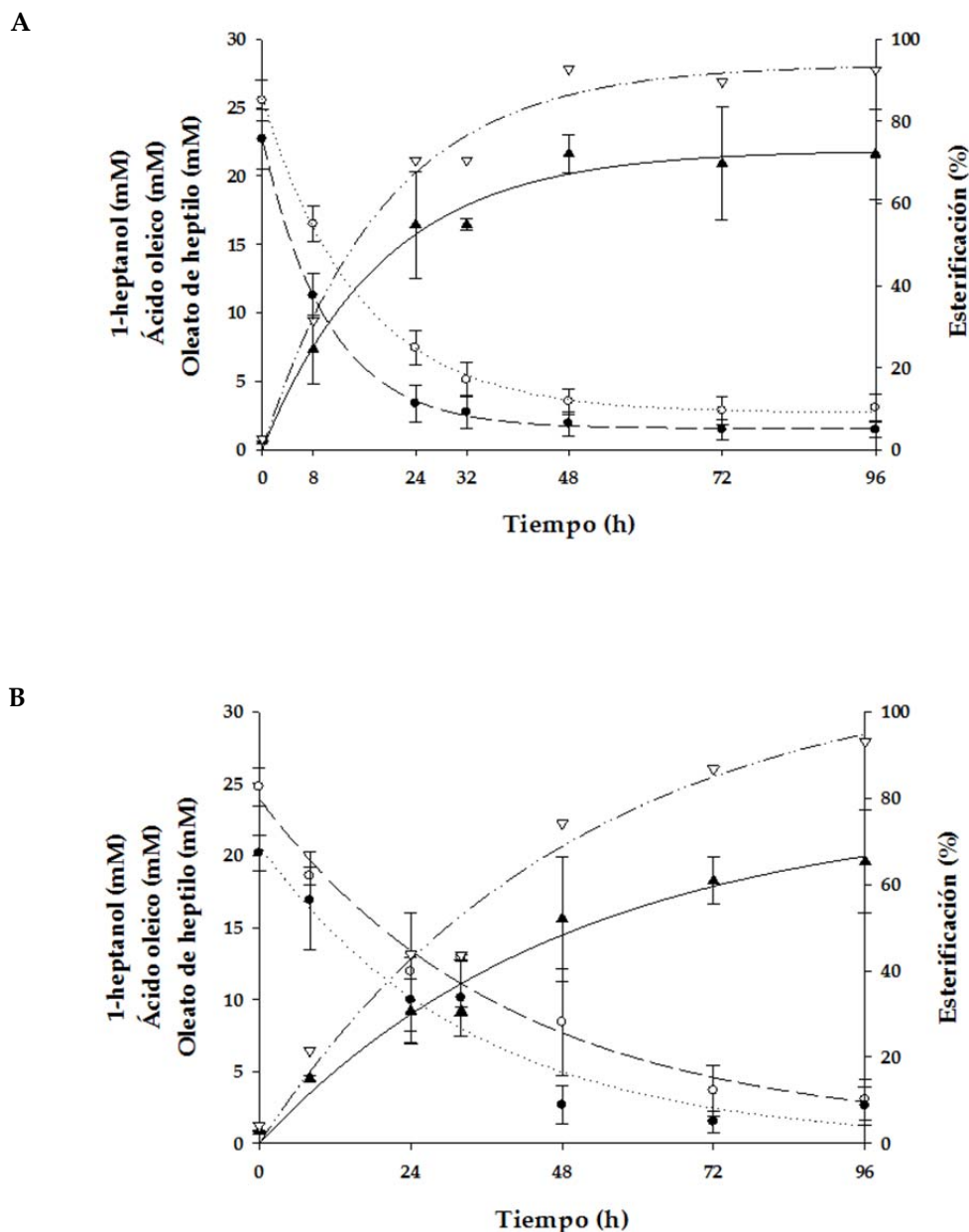
Figura 3.28. Hidrólisis enzimática de PVAc. Aspecto visual de las reacciones (A). Ensayos de actividad en el pH-stato (B): BZM (Buzyme®) y Optz (Optizyme®). Detalle de los espectros de MALDI-TOF de la muestra de PVAc no tratada y tratada con estero esterasa de *O. piceae* (C). Se muestra la masa de la unidad que se repite en cada polímero. Análisis FTIR (D) de un control y una dispersión tratada enzimáticamente del polímero. Se indican las bandas características de PVAc y PVA.

-Resultados-

3.5.2. Síntesis de compuestos de interés.

3.5.2.1. Verificación de la capacidad de las enzimas de *O. piceae* de catalizar reacciones de síntesis

Como ya se estableció previamente (Cárdenas *et al.*, 2001; Sánchez-Montero *et al.*, 1991) la reacción de esterificación entre ácido oleico y 1-heptanol puede considerarse como una reacción estándar para comprobar la capacidad de una lipasa de catalizar reacciones de esterificación en medio orgánico. Ambas enzimas realizaron una conversión cercana al 100% de sustratos en producto (oleato de heptilo) en 72h, aproximándose al 50 y 80% a las 24 h con la enzima recombinante y nativa, respectivamente (figura 3.29). Así se demostró que ambas enzimas eran adecuadas para trabajar en medio orgánico.



3.5.2.2. Síntesis de ésteres de esteroides como nutraceuticos

La producción de ésteres de esteroles en medio orgánico se realizó partiendo de una mezcla de β -sitosterol de soja al 60% de pureza y ácido láurico. Mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas se identificaron los otros esteroides presentes en la mezcla resultando su contenido en β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brasicasterol con abundancias del 54,75%, 29%, 10,25% y 5,98% respectivamente (figura 3.30) (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

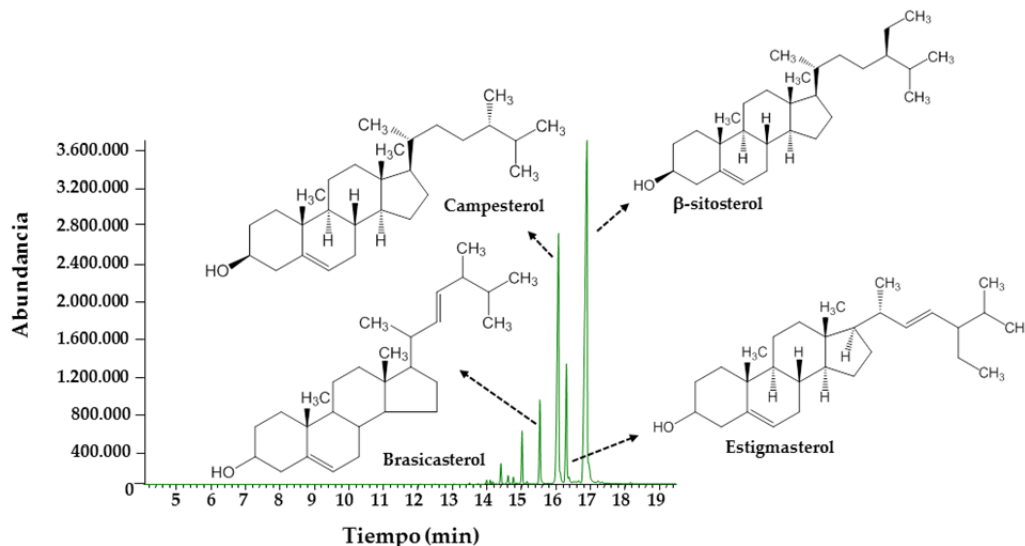


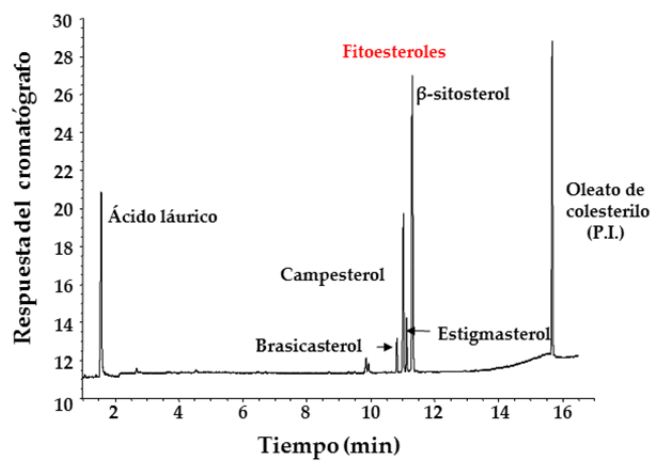
Figura 3.30. Identificación por CG-EM de esteroides vegetales en una mezcla comercial de β -sitosterol. Se indican las fórmulas estructurales de cada uno de ellos.

A tenor de los resultados previos obtenidos con la síntesis de oleato de heptilo, las reacciones de esterificación se realizaron inicialmente en un sistema bifásico isooctano:agua. En primer lugar, se estudió el efecto del exceso de ácido graso en el porcentaje de esterificación alcanzado partiendo de reacciones equimolares 1:1 (esteroides:ácido láurico) hasta reacciones 1:6. La figura 3.31 muestra los cromatogramas de gases ilustrativos de reacciones 1:1 control y tratada con enzima. Los resultados obtenidos con tres enzimas (nativa, recombinante, y comercial de *C. rugosa*) mostraron cómo a medida que aumentaba el exceso de ácido láurico aumentaba la síntesis de los ésteres (figura 3.32). También es importante reseñar cómo el incremento en el exceso de ácido láurico favoreció un menor tiempo de catálisis llegando a tener grandes niveles de esterificación al cabo de 24 horas. Sin embargo, existieron diferencias en cuanto a los grados de esterificación logrados con las tres enzimas, advirtiéndose reacciones más lentas y una concentración menor de producto sintetizado en el caso de la enzima comercial (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

La reacción 1:6 fue la que permitió obtener un mayor porcentaje de esterificación en menor tiempo con cualquiera de las tres enzimas y por ello en el resto de experimentos se empleó este tipo de reacción para estudiar otros parámetros como la dosis de enzima y el efecto del solvente orgánico sobre la síntesis.

-Resultados-

A



B

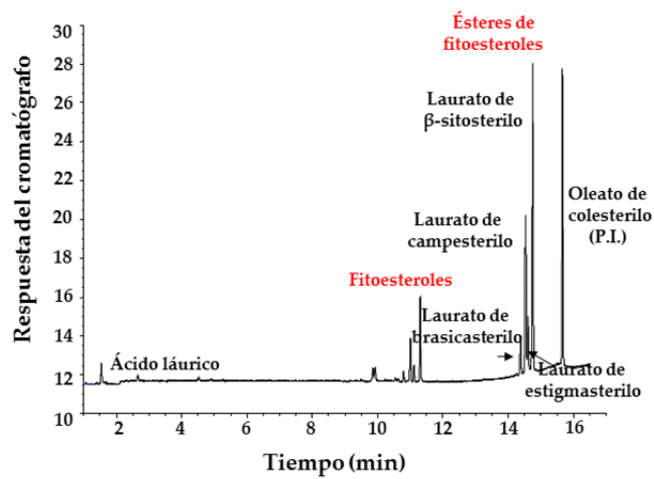


Figura 3.31. Cromatogramas de gases ilustrativos de la reacción de acilación de fitoesteros de soja con ácido láurico mediante reacción de esterificación directa. Control (A) y tratado enzimáticamente con una dosis de 6 U/mL (actividad *vs* pNPB) (B). Relación fitoesteros:ácido graso 1:1 en isooctano tras 48 horas. P.I.: patrón interno (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

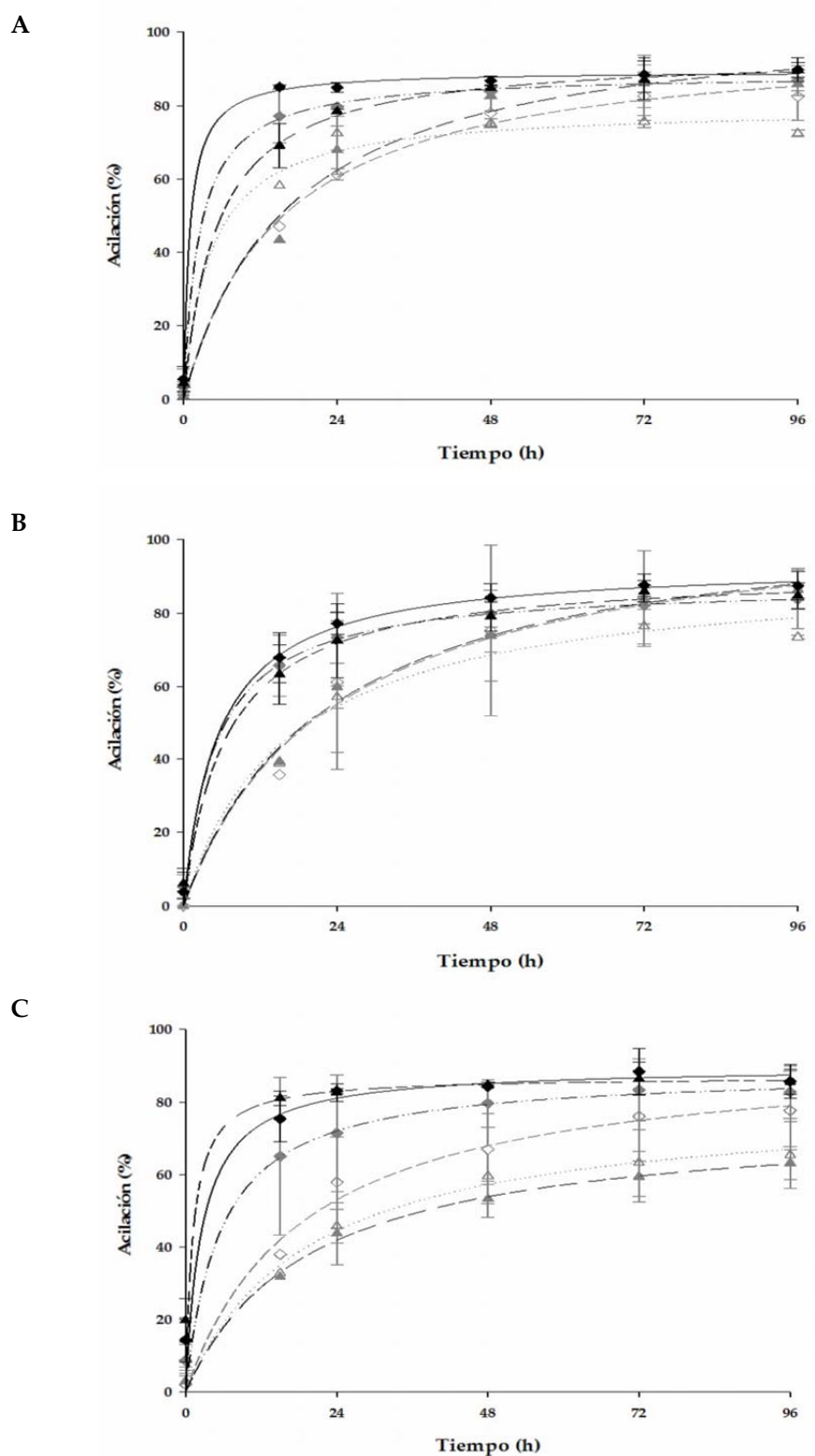


Figura 3.32. Efecto del exceso de ácido láurico en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroides vegetales. Enzima nativa (A) y recombinante (B) de *O. piceae* y comercial de *C. rugosa* (C). Reacción 1:1 (\triangle), reacción 1:2 (\diamond), reacción 1:3 (\blacktriangle), reacción 1:4 (\blacklozenge), reacción 1:5 (\blacktriangle) y reacción 1:6 (\blacklozenge). Los datos representan las medias de dos experimentos distintos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los datos se ajustaron con el programa SigmaPlot 11.0.

-Resultados-

Con respecto al estudio de la dosis de enzima, diferentes cantidades de enzima comprendidas entre 1,5 y 12 U/mL (actividad frente a *p*NPB) se testaron para ver cómo afectaba a la velocidad de la reacción. Los resultados obtenidos con cualquiera de las tres enzimas pusieron de manifiesto que, aparentemente, el resultado final tras 48 h de incubación fue el mismo con cualquiera de las dosis ensayadas (**figura 3.33**) aunque si bien es cierto que cuanto mayor fue la dosis antes se logró obtener el mayor grado de esterificación. De los datos obtenidos se desprende que con 6 U/mL de enzima es suficiente para asegurar alcanzar el mayor porcentaje de esterificación en un tiempo razonable. Con la menor de las dosis ensayadas el porcentaje de acilación o síntesis que se logró con la enzima comercial fue inferior al obtenido con cualquiera de las enzimas de *O. piceae* (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

La influencia de los solventes orgánicos en la enzima; y por tanto en la reacción, se estudió también con las tres enzimas tanto en sistemas bifásicos solvente-agua como en sistemas monofásicos compuestos únicamente por el solvente orgánico. Del primer tipo de estudio se desprendió la siguiente información: aparentemente no existieron diferencias significativas entre las tres enzimas cuando se las comparó frente al mismo disolvente; sin embargo, si se evidenciaron diferencias en el resultado de la reacción entre los distintos disolventes, observándose que el grado de esterificación alcanzado fue mayor en reacciones en isooctano, después en *n*-hexano (aunque con leves diferencias respecto del anterior) y por último fue en tolueno donde se obtuvieron los peores resultados (**figura 3.34A**). En cuanto a los experimentos realizados en ausencia de agua, llamó especialmente la atención la incapacidad de la enzima recombinante de esterificar los sustratos en estas condiciones y sólo en presencia de *n*-hexano se pudieron ver atisbos de actividad de síntesis. Sorprendentemente, la actividad de la enzima nativa y de *C. rugosa* fue incluso mayor que en presencia de agua sobre todo en reacciones realizadas en tolueno donde la enzima comercial exhibió una mayor capacidad de acilación (**figura 3.34B**) (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

Para tratar de mejorar los resultados obtenidos con la enzima recombinante en ausencia de agua se estudió el efecto de distintos tipos de ciclodextrinas. Éstas son compuestos macrocíclicos de estructura toroidal por lo que pueden alojar en su interior hidrofóbico moléculas de naturaleza apolar, como los esteroides vegetales, facilitando su solubilización; además, se ha descrito cómo su presencia en este tipo de reacciones favorece el resultado final con respecto a reacciones en su ausencia. Se procedió a coliofilizar la enzima recombinante con diferentes tipos de ciclodextrinas (α , β y γ) en diferentes proporciones enzima:ciclodextrina (1:1, 1:2 y 1:6) y se comprobó cómo tras el proceso de coliofilización la enzima mantenía su actividad frente a *p*NPB en cualquiera de las situaciones. De este modo se realizó un experimento de síntesis usando como solvente tolueno y añadiendo 6 U/mL de la enzima coliofilizada con las distintas ciclodextrinas y en distintas proporciones durante 96 h a 28°C. Al final del experimento no se observó ninguna mejoría en la reacción; es más, llegó a empeorar puesto que en ninguna de las condiciones ensayadas se halló el menor atisbo de acilación.

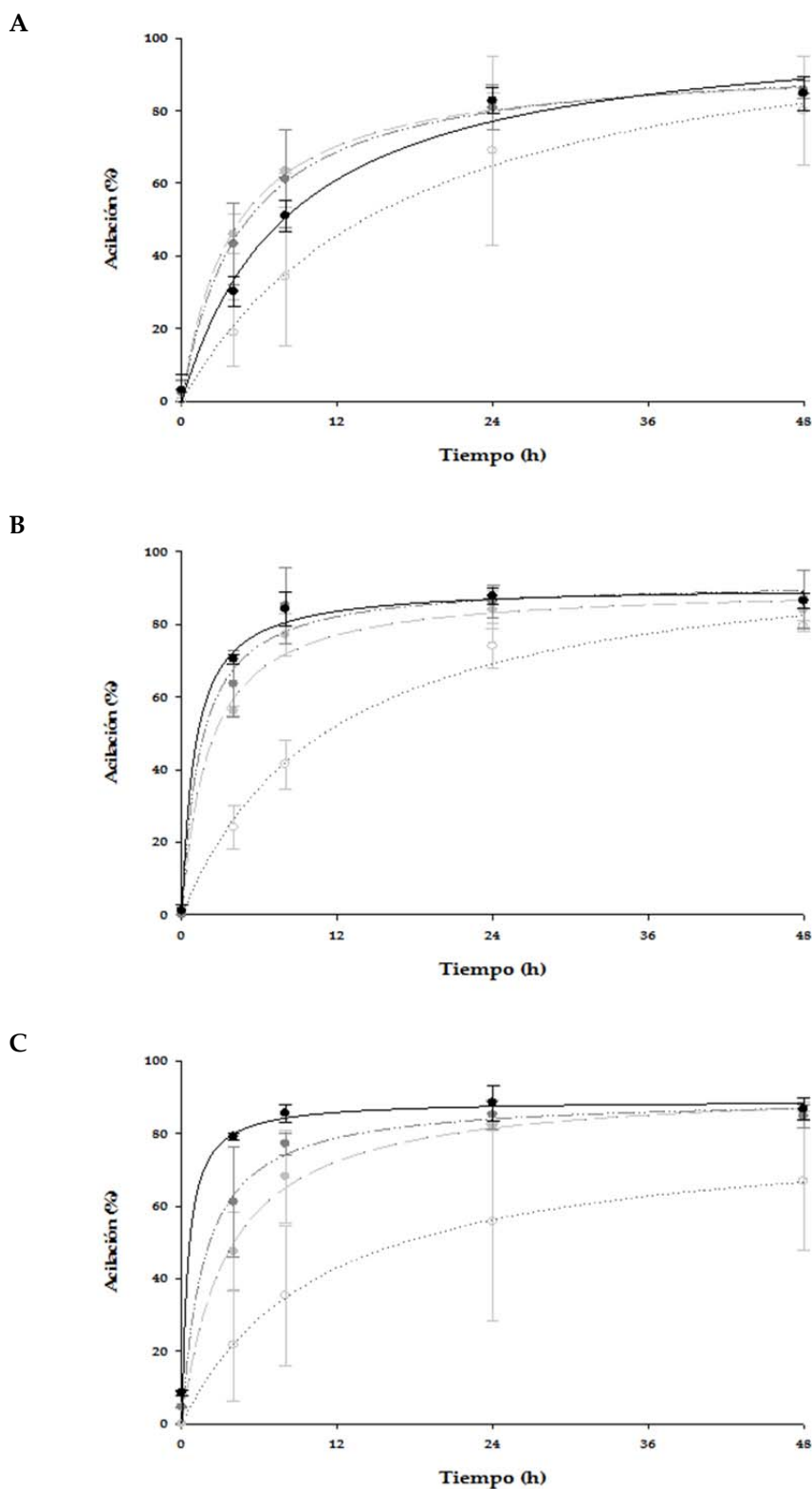


Figura 3.33. Efecto de la dosis de enzima en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroides vegetales. Proteína nativa (A), recombinante (B) de *O. piceae* y comercial de *C. rugosa* (C). Las reacciones se realizaron con un exceso de ácido láurico de 6 respecto de la cantidad de esteroides y en un sistema bifásico durante 48 h. Dosis de enzima: 1,5 U/mL (○), 3 U/mL (●), 6 U/mL (●) y 12 U/mL (●); actividad *vs* pNPB. Los datos representan las medias de dos experimentos distintos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los datos se ajustaron con el programa SigmaPlot 11.0.

-Resultados-

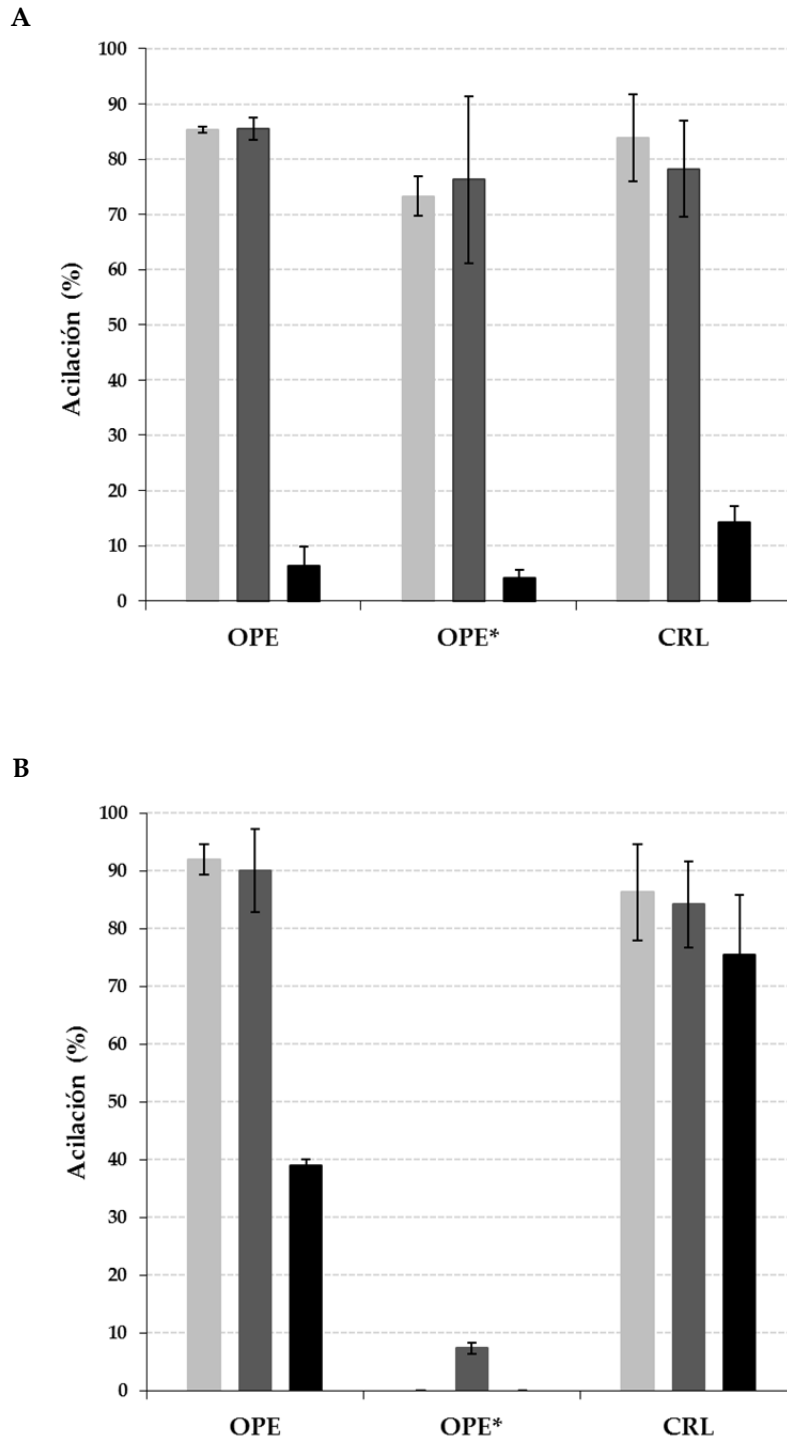


Figura 3.34. Efecto del tipo de solvente orgánico en la acilación, mediante esterificación directa, de esteroides vegetales. Sistemas bifásicos solvente:agua (A) y sistemas monofásicos con sólo el solvente orgánico (B). Isooctano (■), n-hexano (■) y tolueno (■). Las reacciones se realizaron con un exceso de ácido láurico de 6 respecto de la cantidad de esteroides empleando una dosis de enzima de 6 U/mL durante 48 h. Los datos representan las medias de dos experimentos distintos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (Barba Cedillo *et al.*, 2011).

3.6. INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA ENZIMA NATIVA DE *O. piceae* EN DILBEADS™ TA

El soporte Dilbeads™ (**figura 3.35A**) es adecuado para la inmovilización covalente de enzimas para aplicaciones industriales debido a su alta estabilidad mecánica en solución acuosa o medios orgánicos.

La inmovilización se realizó a pH 8,0 pues a este valor de pH los grupos amino de las lisinas y tiol de las cisteínas de la enzima son capaces de unirse al soporte. Según las imágenes obtenidas por microscopía confocal se pudo observar cómo la enzima no se distribuyó uniformemente en las perlas del soporte; sino que la mayoría de las moléculas de enzima estaban confinadas en una capa superficial de aproximadamente 10,5 µm de ancho (**figura 3.35B**) (Torres *et al.*, 2008).

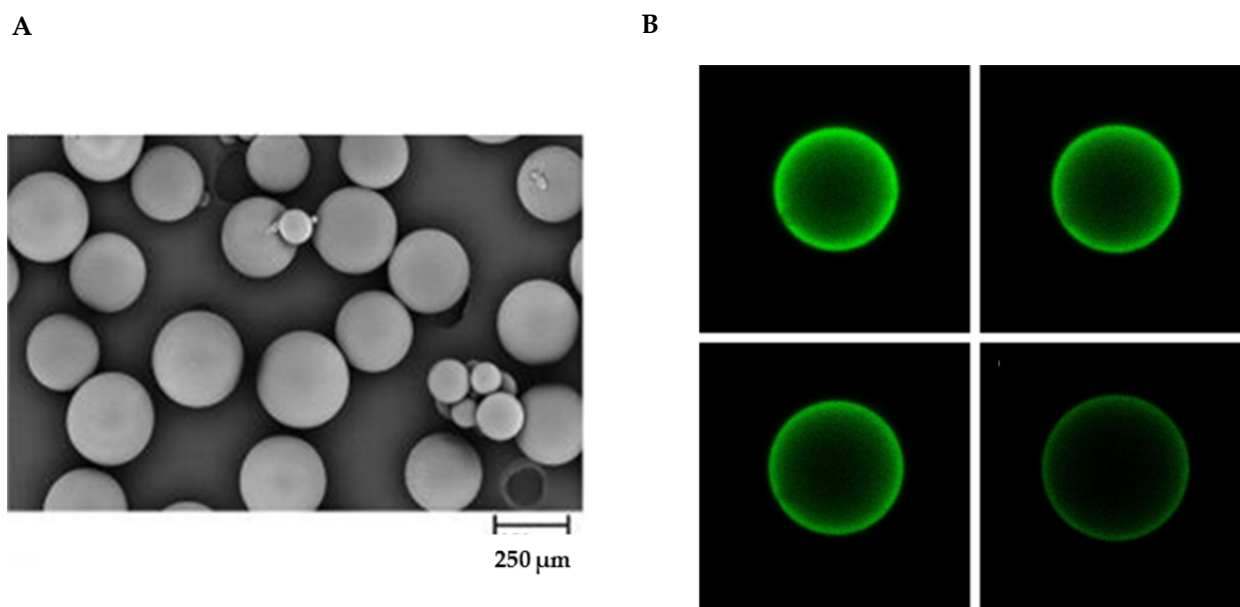


Figura 3.35. Inmovilización de la esterol esterasa de *O. piceae* en Dilbeads™ TA. Micrografía electrónica de barrido a 60X del soporte (A). Imágenes de microscopía confocal de la enzima inmovilizada marcada con isotiocianato de fluoresceína (B): las imágenes corresponden a diferentes profundidades de la sección z de modo que entre cada imagen hay un incremento de 5 µm (Torres *et al.*, 2008).

En cuanto a las propiedades bioquímicas de la enzima inmovilizada, la inmovilización conservó su pH (**figura 3.36A**) y temperatura (**figura 3.37A**) óptimos, incluso permitió ampliar algo el rango en cada caso. En cuanto a su estabilidad al pH, se estudiaron aquellos valores que afectaron más a la enzima soluble; así, la enzima inmovilizada fue estable entre pH 6-8, pero a pH 9 perdió un 30% de actividad tras 24 h (**figura 3.36B**). Respecto a su termoestabilidad, mostró actividades residuales del 75% a 30 y 45 °C y sólo conservó la mitad de su actividad a 60 °C tras 24h de incubación (**figura 3.37B**) (Torres *et al.*, 2008).

-Resultados-

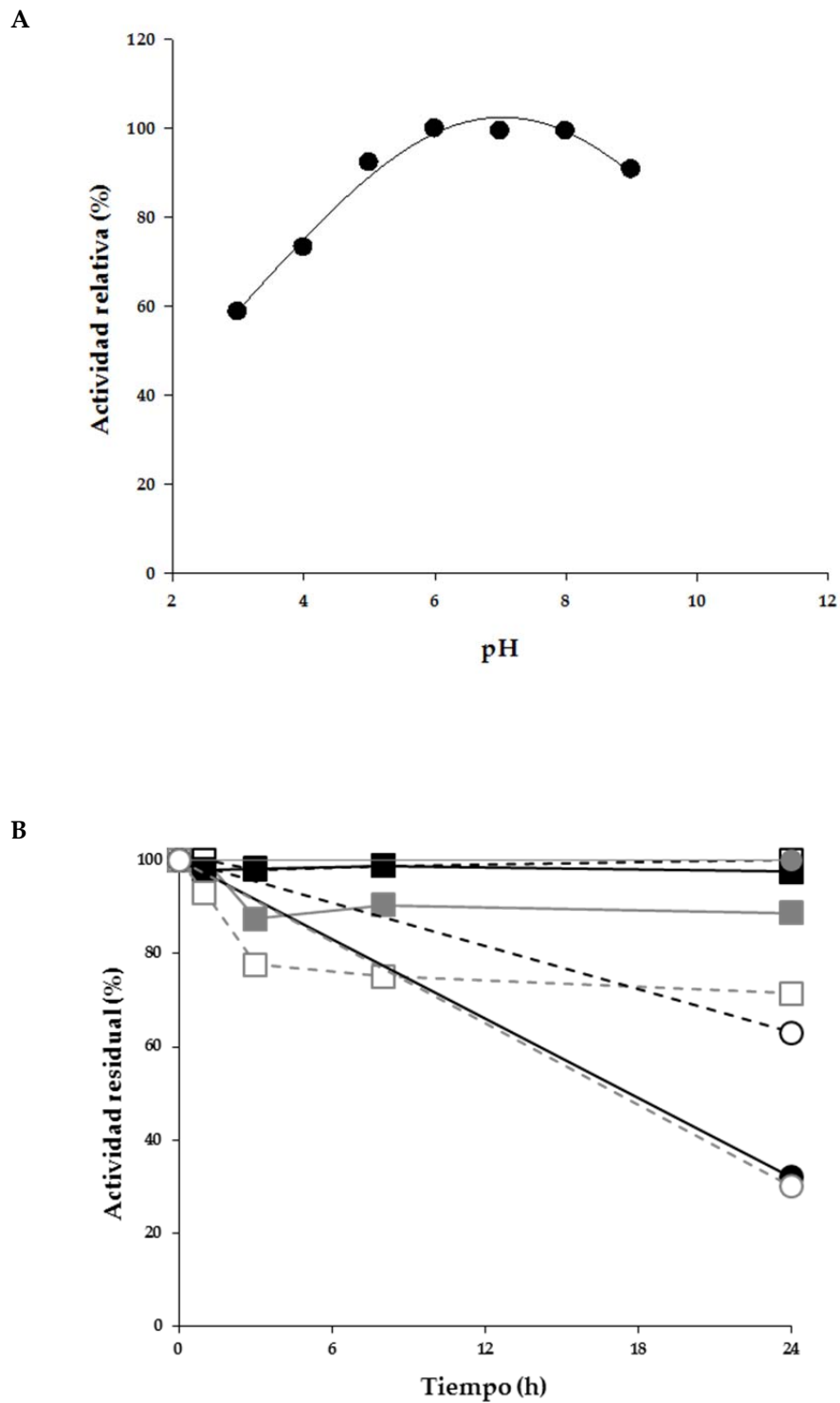


Figura 3.36. Actividad óptima de la enzima inmovilizada (A) y estabilidad frente al pH comparada con la enzima soluble tras 24 h (B). En el caso del pH óptimo los valores experimentales se ajustaron estadísticamente con el programa SigmaPlot 11.0 (—). Enzima inmovilizada: pH 6 (■), pH 7 (□), pH 8 (■) y pH 9 (□). Enzima soluble: pH 6 (●), pH 7 (○), pH 8 (●) y pH 9 (○). Se empleó *p*NPB como sustrato a una concentración de 1,5 mM. Los datos correspondientes a la enzima sin inmovilizar se obtuvieron de Calero-Rueda (Calero-Rueda, 2006) desconociéndose la concentración de la enzima durante los ensayos de estabilidad.

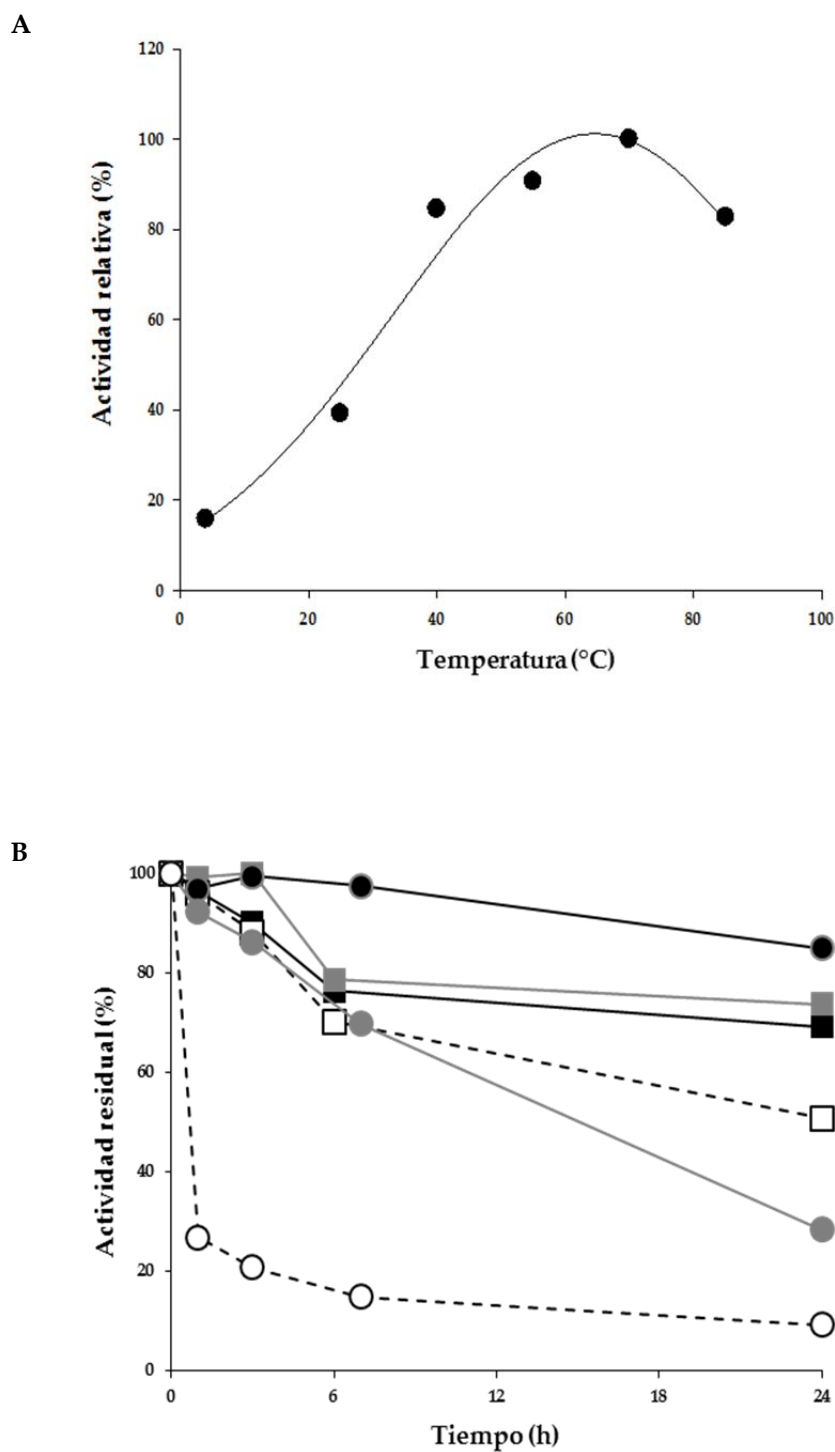


Figura 3.37. Temperatura óptima de la enzima recombinante (A) y termoestabilidad comparada con la enzima soluble tras 24 h (B). En el caso de la temperatura óptima los valores experimentales se ajustaron estadísticamente con el programa SigmaPlot 11.0 (—). Enzima inmovilizada: 30 °C (■), 45 °C (▣) y 60 °C (□). Enzima soluble: 30 °C (●), 45 °C (●) y 60 °C (○). Se empleó *p*NPB como sustrato a una concentración de 1,5 mM. Los datos correspondientes a la enzima sin inmovilizar se obtuvieron de Calero-Rueda, 2006 desconociéndose la concentración de la enzima durante los ensayos de estabilidad.

-Resultados-

En cualquier caso, en comparación con la enzima soluble, la inmovilización de la enzima permitió incrementar considerablemente su estabilidad frente al pH (**figura 3.38A**) y la temperatura (**figura 3.38B**). Por ejemplo, a pH 8 su estabilidad aumentó tres veces y a 60 °C casi seis.

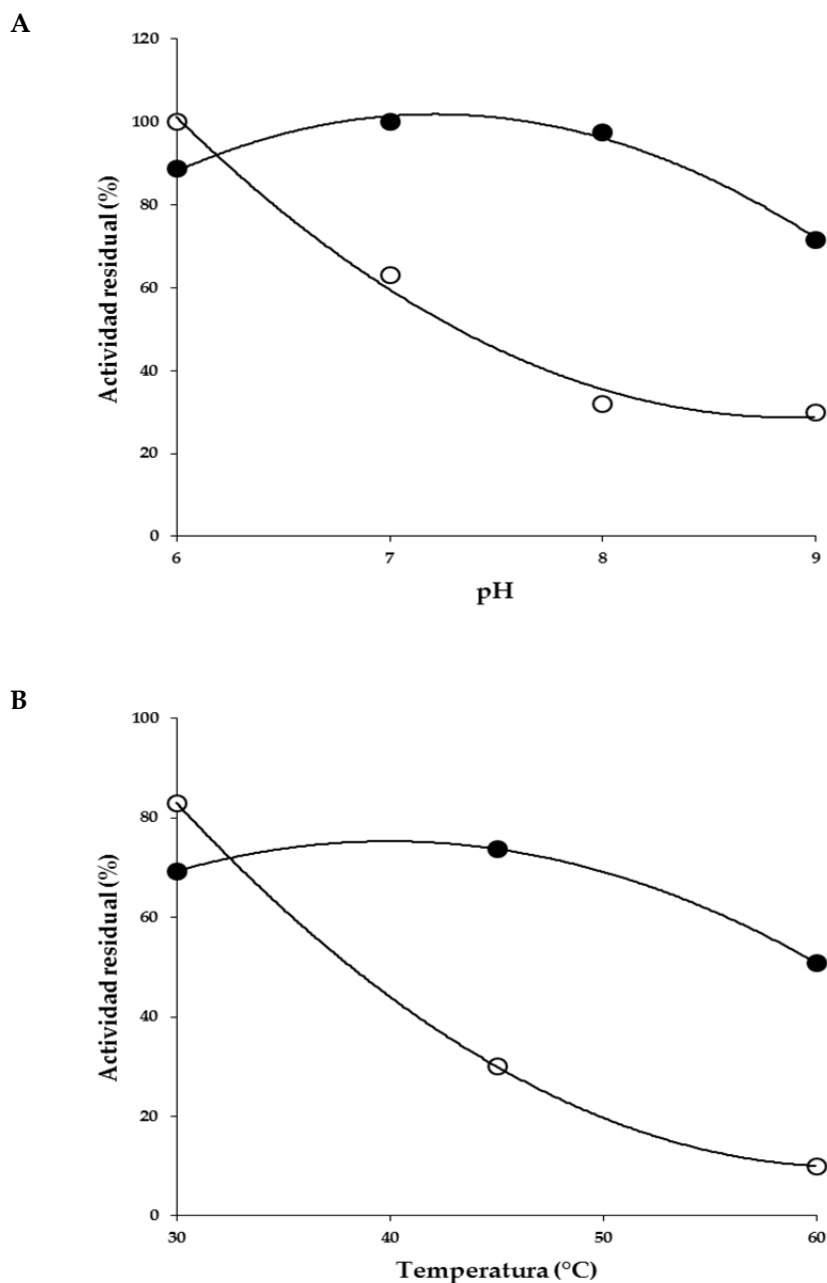


Figura 3.38. Comparación de las estabildades al pH (A) y temperatura (B), tras 24 h de incubación, de las enzimas nativa soluble e inmovilizada. OPE (○) y OPE inmovilizada en Dilbeads™ (●). Los datos correspondientes a la enzima sin inmovilizar se obtuvieron de Calero-Rueda (Calero-Rueda, 2006) desconociéndose la concentración de enzima a la cual se desarrollaron los ensayos de estabilidad.

Por último, para emular el proceso de tratamiento de aguas de proceso de la industria papelera se comprobó cómo la enzima inmovilizada y empaquetada en una columna a modo de biorreactor enzimático siguió manteniendo la capacidad de hidrolizar ésteres de colesterol si bien tras las 24 primeras horas de funcionamiento en continuo su actividad disminuyó para luego estabilizarse a un valor de productividad de 6g de sustrato hidrolizado/h/kg de enzima inmovilizada (Torres *et al.*, 2008).

3.7. CRISTALIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA DE *O. piceae*

La enzima pura concentrada a unos 4mg/ml, en presencia y ausencia del detergente Triton X-100 para evitar su precipitación, se utilizó para la realización de experimentos de cristalización.

De las 880 condiciones diferentes ensayadas los mejores resultados se encontraron con la enzima concentrada en ausencia de detergente con una condición basada en MPD (2-Metil-2,4-pentanediol) como precipitante principal. Los resultados obtenidos mostraron pequeños cristales con forma de aguja tan finos que no se pudieron utilizar para resolver la estructura 3D de la proteína.

4. DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DE LA ESTEROL ESTERASA POR *O. piceae*

En los cultivos del ascomiceto suplementados con aceite de oliva la actividad enzimática aumentó una vez que se había consumido la fuente primaria de carbono; es decir, la glucosa. Además, llegó un momento en el que el crecimiento fúngico llegó a fase estacionaria y se estabilizó. Aún así, la actividad aumentó paralelamente a la concentración de proteínas durante esta fase lo que indicó que la enzima esterol esterasa es una enzima mayoritaria (Calero-Rueda, 2001).

Se sabe que distintas fuentes de carbono como la glucosa y los sustratos de naturaleza lipídica pueden afectar la producción de lipasas reprimiéndola y estimulándola respectivamente (Lotti *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2004). Este aspecto parece claro a tenor de los resultados obtenidos; ya que no es hasta el agotamiento de la glucosa cuando empieza a detectarse actividad esterasa en el medio, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos (Calero-Rueda, 2001). También la fuente de nitrógeno tiene una influencia importante en la producción de enzimas lipolíticas por los hongos; de hecho, existen estudios realizados en *O. piceae* que lo demuestran (Gao y Breuil, 1995).

Hongos como *Ophiostoma piliferum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* y *C. rugosa* se caracterizan por producir múltiples isoformas de lipasas (Brush *et al.*, 1999; Lotti *et al.*, 1998). De hecho, muchas de las preparaciones de lipasas comerciales son en realidad un crudo enzimático con diferentes isoenzimas (Bjurlin *et al.*, 2002). Parece ser que las condiciones de cultivo, incluyendo su composición, estarían relacionadas con la producción de las diferentes isoformas encontradas para cada organismo (Lotti *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 1999; Schmidt-Dannert, 1999).

El análisis reciente del genoma y transcriptoma de *O. piceae* (Haridas *et al.*, 2013) ha permitido saber que existe un gran número de lipasas y/o esterol esterases que pueden ser producidas por este organismo. La presencia de este tipo de enzimas estaría relacionada con el nicho ecológico que ocupa, principalmente madera seca de pino (Fleet *et al.*, 2001), caracterizado por una baja humedad y por ser pobre en nutrientes conteniendo muy poco nitrógeno (~0,05% del peso seco de la madera) (Abraham *et al.*, 1998) y bajos niveles de defensas químicas del hospedador (Eberhardt *et al.*, 2009). En estas condiciones el hongo necesita activar la producción de melanina para hacer frente a factores abióticos (dsecación, radiación UV, temperaturas extremas y compuestos tóxicos) (Butler y Day, 1998) así como sistemas de transporte para secretar enzimas que rompan los sustratos externos complejos y después importar los nutrientes al interior de las células al mismo tiempo que ha de modificar o eliminar sustancias tóxicas, producidas por el hospedador como defensa, y que penetran en las células como monoterpenos. Triglicéridos y ácidos grasos son importantes compuestos lipídicos presentes en la albura de pino, pueden ser hasta el 3% de su peso seco, y son una fuente de carbono principal para *O. piceae* (Gao *et al.*, 1994). El estudio transcriptómico (Haridas *et al.*, 2013) reveló que cuando el hongo se creció en presencia de aquellos 25 genes se sobreexpresaron y de ellos 18 se predijeron como proteínas secretadas. Sin embargo, inesperadamente, de los genes diferencialmente sobreexpresados ninguno correspondió a lipasas fúngicas, tal vez porque en estas condiciones se produjeran muy pronto durante el crecimiento como vieron Gao y Breuil (Gao y Breuil, 1995) y en el estudio el micelio se recolectara tras siete días de cultivo en medio sólido. 23 de esos 25 genes se predijeron como genes involucrados en la hidrólisis de carbohidratos. Cuando el crecimiento se produjo sobre serrín de albura, sustrato natural del hongo, aumentó la expresión de 91 genes, muchos de ellos transportadores para la adquisición de nutrientes como azúcares y nitrógeno (en forma de aminoácidos y proteínas, principalmente), otros para resistencia a químicos o detoxificación, etc. mostrando la complejidad de las fuentes de nutrientes usadas por *O. piceae*. En este caso se indujeron adicionalmente otros 22 genes que lo estuvieron también cuando se creció al hongo en presencia de triglicéridos y ácidos grasos. Finalmente, se pudo identificar una lipasa secretada (OPP-00605), con una actividad predicha de degradación de triglicéridos, cuyo transcrito abundaba al menos 50 veces más en el micelio creciendo en albura de pino que en un control con manosa (Haridas *et al.*, 2013).

-Discusión-

En lo que respecta a esta tesis, bajo las condiciones ensayadas, sólo se ha detectado y purificado una única enzima como ya hiciera Calero-Rueda (Calero-Rueda *et al.*, 2002); aunque en otra cepa de este hongo (387N) se caracterizó otra enzima con actividad lipasa pero diferentes propiedades bioquímicas (Gao y Breuil, 1998). Hoy, gracias a la secuenciación de su genoma (cepa UAMH 11346) se sabe que el hongo podría producir unas cuarenta enzimas con actividad lipasa cuando se realiza una búsqueda en la base de secuencias proteicas UniProt (*Universal Protein Resource*) (Bateman *et al.*, 2015), concretamente existen tres genes que parece que codificarían para las esterol esterases con los códigos identificadores de UniProtKB (*Protein knowledgebase*) S3D3T7, S3CA17 y S3CQH7. Las dos primeras son proteínas predichas por homología que en principio presentan un dominio transmembrana; mientras que la última es una proteína extracelular, inferida por homología con ortólogos de especies cercanas, que presenta una identidad del 89% respecto de la enzima objeto de esta tesis con identificador Q2TFW1 (Calero-Rueda *et al.*, 2002; Calero-Rueda *et al.*, 2009). La secuencia S3CQH7 presenta una longitud de 579 aminoácidos correspondiendo los primeros diecinueve a una secuencia de externalización; la secuencia Q2TFW1 es de 549 aminoácidos. Se podría pensar que se trata de la misma proteína y que las diferencias observadas se deben a la anotación del genoma y a diferencias entre cepas. Por otro lado, existen otras secuencias de lipasas que presentan una longitud cercana a la de Q2TFW1 pero con porcentajes de identidad de entorno al 24%; algunas de ellas son S3CXX3, S3CE63 y S3C1B3.

4.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ESTEROL ESTERASA DE *O. piceae* EN *P. pastoris*

Las técnicas de ingeniería genética tienden a conseguir enzimas a medida que, junto con la posibilidad de sobreexpresarlas en el organismo adecuado, permiten obtener grandes cantidades de enzima a bajo coste. La levadura metilotrófica *P. pastoris* se ha convertido en los últimos años en un atractivo organismo para la producción heteróloga a escala industrial de proteínas (Gellissen, 2000; Schmidt-Dannert, 1999).

Ya se mencionaron varias ventajas del uso de *P. pastoris* como biofactoría para la producción de proteínas recombinantes en la introducción (sección 1.5.3). Una razón adicional por la cual se optó por este sistema para expresar la esterol esterasa de *O. piceae* fue que otras lipasas fúngicas con las que guarda una considerable identidad de secuencia se han expresado con éxito en esta levadura; por ejemplo, las diferentes isoenzimas (LIP1-LIP5) de *C. rugosa* (Brocca *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2006a; Chang *et al.*, 2006b; Ferrer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2002b; Lee *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2001) y *G. candidum* (Catoni *et al.*, 1997; Holmquist *et al.*, 1997), así como la esterol esterasa de *M. albomyces* (Kontkanen *et al.*, 2006a).

4.2.1. Expresión en Erlenmeyer

La transformación de *P. pastoris* con el vector pPIC9OPE linealizado garantiza la estabilidad génica de los transformantes al integrarse por recombinación homóloga en el genoma de la levadura (Domínguez *et al.*, 1998). Por otro lado, el empleo de la secuencia señal del Factor α de *S. cerevisiae* permite la secreción de la proteína recombinante y su recuperación de un modo sencillo del medio. Esta señal de secreción es una de las más utilizadas con éxito, siendo en algunos casos mejor que la propia secuencia señal de la proteína nativa (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Schmidt-Dannert, 1999). Se optó por utilizar un sistema basado en el pAOX1, fuertemente regulado por una fuente de carbono dependiente de un mecanismo de represión/inducción, porque permite separar la fase de crecimiento de la de expresión, garantizando altos niveles de producción. Con esta estrategia se trataba de evitar la utilización de promotores constitutivos con los que no se han obtenido altos niveles de expresión en otras enzimas a pesar de haberse utilizado en algunos casos industrialmente (Domínguez *et al.*, 1998; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Dado que la transformación en *P. pastoris* ocurre por integración del ADN recombinante en el gen de la AOX1 del genoma de la levadura por recombinación homóloga, puede existir una cierta variabilidad en los niveles de expresión de los distintos transformantes (variación clonal), de ahí que sea necesario realizar una selección previa de los transformantes más prometedores. La selección de los clones de *P. pastoris* Mut⁺ con actividad esterol esterasa se llevó a cabo mediante el uso de un ensayo de actividad en placa (Cregg *et al.*, 2009) basado en la hidrólisis de tributirina en medio MM, que mostró halos claros en los

transformantes positivos (**figura 3.2**). Inicialmente, se seleccionaron cinco clones positivos para la producción de la esterasa en matraz Erlenmeyer de 1 litro con diferentes volúmenes de medio líquido BMMY. En cualquier caso, todos los clones secretaron niveles de actividad más altos que los alcanzados con *O. piceae*. Sin embargo, los niveles más altos (hasta 18 U/ml) se obtuvieron cuando se utilizó un menor volumen de medio de cultivo (Calero-Rueda *et al.*, 2009), debido al aumento en la tasa de transferencia de oxígeno. Esta es una de las diferentes estrategias propuestas para facilitar dicha transferencia en cultivos en matraces Erlenmeyer (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Rosenfeld, 1999). Cuando se produce la integración del *cassette* de expresión, ya sea por sobrecruzamiento sencillo o por reemplazamiento génico (doble sobrecruzamiento), hay de un 10-50% de frecuencia de que se inserte sólo la secuencia HIS4 sin otras secuencias del vector, de ahí que resulte necesario comprobar los transformantes (Higgins y Cregg, 1998).

Seleccionado el transformante resulta de interés realizar unas pruebas de producción en base a medios de diferentes características para determinar las condiciones óptimas para la producción de la enzima. Considerando que *P. pastoris* es capaz de crecer en un rango de pH entre 3,0 y 7,0, sin apenas influir en su crecimiento (Macauley-Patrick *et al.*, 2005), se emplearon tres tipos de medios tamponados (BMMY, BMM y YEPS), indicados para la producción de enzimas si el pH es un factor importante que pueda afectar a su actividad, y un medio de cultivo no tamponado (MM) indicado para la inactivación de proteasas con actividad óptima a pH neutro. Asimismo, ya que la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* está estrechamente conectada a los rendimientos de crecimiento, se estudió el uso de una fuente de carbono adicional en la producción de biomasa, y así en la expresión de la proteína recombinante.

Inicialmente, la producción se llevó a cabo a pequeña escala en matraces Erlenmeyer en dos etapas (salvo con el medio YEPS): una primera etapa de generación de biomasa en un medio en el que la expresión estaba reprimida por la presencia de glicerol, seguida de una fase de producción en la que las células fueron inducidas con metanol. Estas dos etapas son necesarias porque la producción heteróloga de proteínas en *P. pastoris* está ligada al crecimiento, por lo que es necesario optimizar la producción de biomasa para obtener grandes cantidades de la proteína deseada (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). La producción de grandes cantidades de proteína en matraces Erlenmeyer es difícil debido a las limitaciones de volumen, transferencia de oxígeno, adición de sustrato y la problemática de controlar estos factores de un modo adecuado, siendo sin duda preferible el empleo de biorreactores (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). No obstante, todas las incubaciones se realizaron en un volumen de medio diez veces menor a la capacidad del matraz y a altas rpm para favorecer la aireación, parámetro crucial durante la expresión con transformantes Mut⁺ (Daly y Hearn, 2005); a una temperatura de 28 °C y en todos los casos empleando una concentración de metanol de 5 g/L.

Como el metanol es un mal sustrato energético produciendo en teoría sólo 6 moléculas de ATP, tanto en la vías asimilatoria como desasimilatoria (Jahic *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003), la producción de biomasa en los medios con metanol como única fuente de carbono (MM, BMM y BMMY) fue menor que la obtenida en el medio con sorbitol (YEPS) (**figura 4.1**).

Las mejores producciones se obtuvieron con los medios tamponados. Estos resultados pusieron de manifiesto un posible efecto del pH del medio sobre la actividad de la enzima ya que el pH del medio MM tendió a acidificarse con el tiempo del cultivo, alcanzándose valores de 2,0 unidades de pH a las 48 h de incubación. Asimismo, el uso de cualquiera de los medios complejos o sin búfer podría contribuir a disminuir el efecto de las proteasas durante el cultivo de *P. pastoris*. En el primer caso, medios BMMY y YEPS, el extracto de levadura y la peptona no sólo mejorarían el crecimiento de la levadura, lo que repercutiría también en los niveles de expresión (la biomasa puede ser unas dos veces mayor que en el medio BMM), de acuerdo con los resultados previamente obtenidos por otros autores, sino que también desempeñarían una función importante en la estabilidad de la proteína recombinante ya que pueden ser sustratos para proteasas y podrían suprimir su expresión cuando existe una limitación en la fuente de nitrógeno (Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). En el segundo caso, medio MM, el crecimiento de la levadura provoca una caída en el pH, lo que favorece la inactivación de las proteasas

-Discusión-

(Invitrogen™, 2002a). Todos estos hechos podrían explicar los mejores niveles de actividad que se encuentran en el medio BMMY en comparación con el medio BMM, y la muy baja actividad detectada en el medio MM. Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores que describen como los niveles de actividad más altos de la cinnamoil-esterasa de *A. niger* expresada en la levadura se alcanzaron cuando se utilizaron medios complejos tamponados (Juge *et al.*, 2001). Sin embargo, también existen resultados opuestos como el caso de la esterol esterasa recombinante de *M. albomyces* que bajo estas condiciones de cultivo se obtuvieron bajos niveles de actividad (Kontkanen *et al.*, 2006a). Por otro lado, y también de acuerdo con nuestros datos, no se detectó actividad de la lipasa de *G. candidum* en cultivos en medio MM (Holmquist *et al.*, 1997), probablemente debido a una disminución pronunciada en el pH con el tiempo (alrededor de 2), lo que provocaría la desnaturalización de la enzima.

Además, dadas las características del promotor usado para la expresión de esta enzima, se podría considerar que la presencia de una fuente de carbono alternativa al metanol, como es el sorbitol, daría lugar a una represión de la expresión. Sin embargo, se ha visto que esta fuente de carbono adicional, así como el manitol o la trehalosa, pueden favorecer el crecimiento durante la fase de inducción sin reprimir la expresión (Daly y Hearn, 2005).

En cualquier caso, con todos los medios, a excepción del MM, se obtuvieron niveles de enzima superiores a los obtenidos con *O. piceae* y en un menor tiempo de incubación. El mejor medio fue el YEPS donde otros autores han encontrado una elevada densidad del cultivo y, como consecuencia, grandes niveles de expresión (Brocca *et al.*, 2003). El alto nivel de inducción obtenido en estos medios está de acuerdo con la utilización de un promotor (pAOX1) fuertemente inducible durante el crecimiento de las células en presencia de metanol (Faber *et al.*, 1995).

4.2.2. Estudios de inducción/desrepresión del pAOX1

El pAOX1 está controlado por un sistema de represión/desrepresión y de inducción donde el metanol actúa como un inductor y otras fuentes de carbono, tales como glucosa o glicerol, como represores (Lin-Cereghino *et al.*, 2002). Ya se ha comentado que el sorbitol ha sido descrito como una fuente de carbono que no reprime la expresión de proteínas recombinantes bajo el control de pAOX1 (Inan y Meagher, 2001). Varios trabajos hablan sobre su uso como co-sustrato durante el crecimiento de la levadura a nivel de biorreactor, a fin de equilibrar el potencial de la carga metabólica que supone la sobreexpresión de una proteína recombinante que, además, podría desencadenar la ruta UPR (*Unfolding Protein Response*) (Ramón *et al.*, 2007). Esta respuesta implica la inducción de chaperonas y foldasas y la acción del proteasoma (Whyteside *et al.*, 2011).

En la sección 3.2.3 se mencionó que la presencia de sorbitol en el medio YEPS dio niveles de actividad esterasa 3 veces mayores que en cultivos inducidos por metanol, en comparación con un medio similar sin sorbitol (BMMY). Aunque en ausencia de metanol sería de esperar que no hubiera producción de enzima, se detectaron actividades de 6 y 0,5 U/ml, respectivamente, en los medios no inducidos YEPS y YEP (**figura 3.4A**). Teniendo en cuenta los mecanismos de regulación de los genes de la ruta MUT y cómo la interacción entre estos mecanismos modula la respuesta del organismo a un ambiente en particular (Hartner y Glieder, 2006), *P. pastoris* expresa altos niveles de AOX1 cuando el alcohol es la única fuente de carbono en el medio, mientras que no se observa expresión en células en crecimiento en glicerol o glucosa, y se observa sólo una parte relativamente pequeña de respuesta de desrepresión (1-2%) tras un periodo privadas de fuente de carbono (Tschopp *et al.*, 1987). Así, los bajos niveles de actividad detectados en cultivos no inducidos podrían ser una consecuencia de la expresión basal desreprimida de gen *aox1* como se ha visto también en otras ocasiones (Ramón *et al.*, 2007).

Sin embargo, es de destacar que la actividad esterasa alcanzó en cultivos con sorbitol no inducidos (YEPS) niveles 2,4 veces mayores que los obtenidos en cultivos inducidos con el medio YEP. Estos resultados sugieren que, de algún modo, el sorbitol debe promover la desrepresión del pAOX1 permitiendo la expresión heteróloga de la enzima. Este resultado constituye el primer informe de una

estimación cuantitativa del efecto de la desrepresión ejercida por el sorbitol en genes de la vía MUT; ya que hasta el momento, no se habían publicado datos que permitieran estimar la fuerza del efecto desrepresor (Hartner y Glieder, 2006). Tales resultados pueden reflejar su papel en la modulación del estrés celular, evitando una posible carga metabólica, y la activación de la respuesta UPR. Además, ha sido sugerido el papel del sorbitol como chaperona molecular favoreciendo la expresión de una proteína fluorescente verde recombinante soluble (Prasad *et al.*, 2011). Esta función podría contribuir también a explicar el efecto positivo del sorbitol en la producción de la esterol esterasa recombinante.

En cualquiera de los casos la enzima recombinante fue una de las enzimas mayoritarias secretada por *P. pastoris* (figura 3.4B).

Por otro lado, la concentración de metanol es fundamental para conseguir altos niveles de proteínas recombinantes en las cepas de *P. pastoris* utilizando pAOX1. Se pudo comprobar cómo usar una concentración de 10 g/L del inductor supuso un pequeño efecto inhibitorio en términos de actividad específica con respecto a usar 5 g/L de acuerdo a Kobayashi *et al.* (Kobayashi *et al.*, 2000) que vieron cómo la tasa de crecimiento en esta fuente de carbono sigue una cinética de tipo Monod a concentraciones bajas; sin embargo, a concentraciones altas (a partir de 5 g/L) se observa un efecto inhibitorio.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

La enzima recombinante se purificó a partir de medio YEPS (con metanol) en una sola etapa cromatográfica, con un factor de purificación más alto que el obtenido para la enzima nativa (Calero-Rueda *et al.*, 2002). La LIP3 de *C. rugosa* se purificó con un procedimiento similar, pero produciendo cantidades más bajas de proteínas (Chang *et al.*, 2006b).

La enzima purificada puede trabajar en una amplia gama de pHs manteniendo más del 50% de su actividad inicial; tal y como se ha comprobado para la LIP3 recombinante (Chang *et al.*, 2006b), y es termoestable a 4 y 30 °C durante 24 horas en las condiciones ensayadas. En cualquier caso, en la comparación entre la proteína nativa y recombinante, esta última mostró una mayor estabilidad a pH alcalino y menor temperatura óptima, lo que podría ser ventajoso para su aplicación industrial. Al igual que la enzima nativa (Calero-Rueda *et al.*, 2002), la enzima recombinante fue inhibida por Hg²⁺, aunque el efecto de este ión fue más drástico que con la nativa, sugiriendo la importancia de grupos -SH para su actividad; lo mismo ocurrió con los detergentes ensayados con un efecto mucho más marcado sobre su actividad en comparación con la nativa.

Con el fin de explicar los cambios observados en la enzima recombinante, no sólo en la temperatura óptima, sino también en los parámetros cinéticos mejorados (tabla 3.4) se consideró la existencia de diferentes modificaciones postraduccionales.

En cuanto a la glicosilación, se ha descrito que la presencia de largas cadenas exteriores de azúcares puede potencialmente interferir con el plegamiento y la función de una proteína (Lin-Cereghino y Cregg, 2000). Sin embargo, los experimentos de dicroísmo circular (figura 3.13) indican que la proteína recombinante no está mal plegada y se dedujo una estructura secundaria idéntica para ambas proteínas. Además, la N-glicosilación no parece ser necesaria para el mantenimiento de la actividad hidrolítica de estas proteínas, como se deduce a partir de experimentos de desglicosilación (figura 3.16). Del mismo modo, la lipasa B de *Candida antarctica* (Larsen *et al.*, 2008) y LIP4 de *C. rugosa* (Tang *et al.*, 2001) han mantenido propiedades cinéticas comparables después de su expresión en *E. coli*, aunque la forma glicosilada de LIP4 producida en *P. pastoris* tuvo mayor estabilidad térmica.

A raíz de los resultados conocidos (Calero-Rueda *et al.*, 2009) se suponía que en la secuencia de *O. piceae* existía por comparación y homología de secuencias con las lipasas-esterol esterases de *C. rugosa* un único sitio de N-glicosilación ocupado por un 8% de carbohidrato; sin embargo, aparecen tres secuencias Asn-Xaa-Ser/Thr (Boraston *et al.*, 2001) que serían potencialmente glicosiladas en la enzima recombinante

-Discusión-

(Asn110, Asn350 y Asn368) ya que es algo extraño, que el aumento de glicosilación en ella se pueda explicar por la adición de una única cadena de carbohidratos más larga que las que suele añadir la levadura normalmente pues en el caso que nos ocupa no se encuentran secuencias NNTT que son responsables de generar hiperglicosilación (Daly y Hearn, 2005). Mediante MALDI-TOF/TOF se intentó averiguar si estos tres sitios se encontraban glicosilados pero por los límites de sensibilidad de la técnica no se pudo. No obstante, y según datos bibliográficos, como en ninguno de ellos Xaa es una prolina ni en las cercanías hay alguna prolina (P) localizada C-terminal, la probabilidad de que estos sitios queden inhibidos para glicosilarse es remota. En el caso de los dos últimos sitios potenciales de N-glicosilación, ésta podría estar inhibida al ser el Xaa un aminoácido hidrófobo: Ile y Ala respectivamente, al inhibirse el primer paso de adición de Glc3Man9GlcNAc2. Sin embargo, estudios realizados con la glicoproteína del virus de la rabia (RGP) en los que por mutagénesis dirigida se construyeron 20 variantes de proteína cada una con un único sitio potencial de N-glicosilación NXS donde en cada una de las 20 variantes X era uno de los 20 aminoácidos se demostró que el porcentaje de glicosilación en las variantes con los sitios NIS y NAS era de un 85% y un 82% respectivamente (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996), en relación a esto, el hecho de que en estos dos últimos casos el tercer aminoácido de la secuencia sea además treonina en vez de serina favorece la glicosilación (Daly y Hearn, 2005). Además, teniendo en cuenta que se ha informado sobre el incremento en la movilidad electroforética del dominio extracelular del receptor de la activina de entre 4-5 KDa por cada sitio de glicosilación y que la introducción de un único punto de glicosilación en la posición 106 de la cistatina de pollo resultó ser glicosilada tras su expresión en *P. pastoris* aumentando el peso molecular de la proteína 6,5 KDa (Daly y Hearn, 2005), no sería raro considerar que el incremento de unos 18 KDa en el peso molecular de OPE* respecto de la forma nativa podría ser debido a un incremento de unos 6 KDa por sitio de glicosilación.

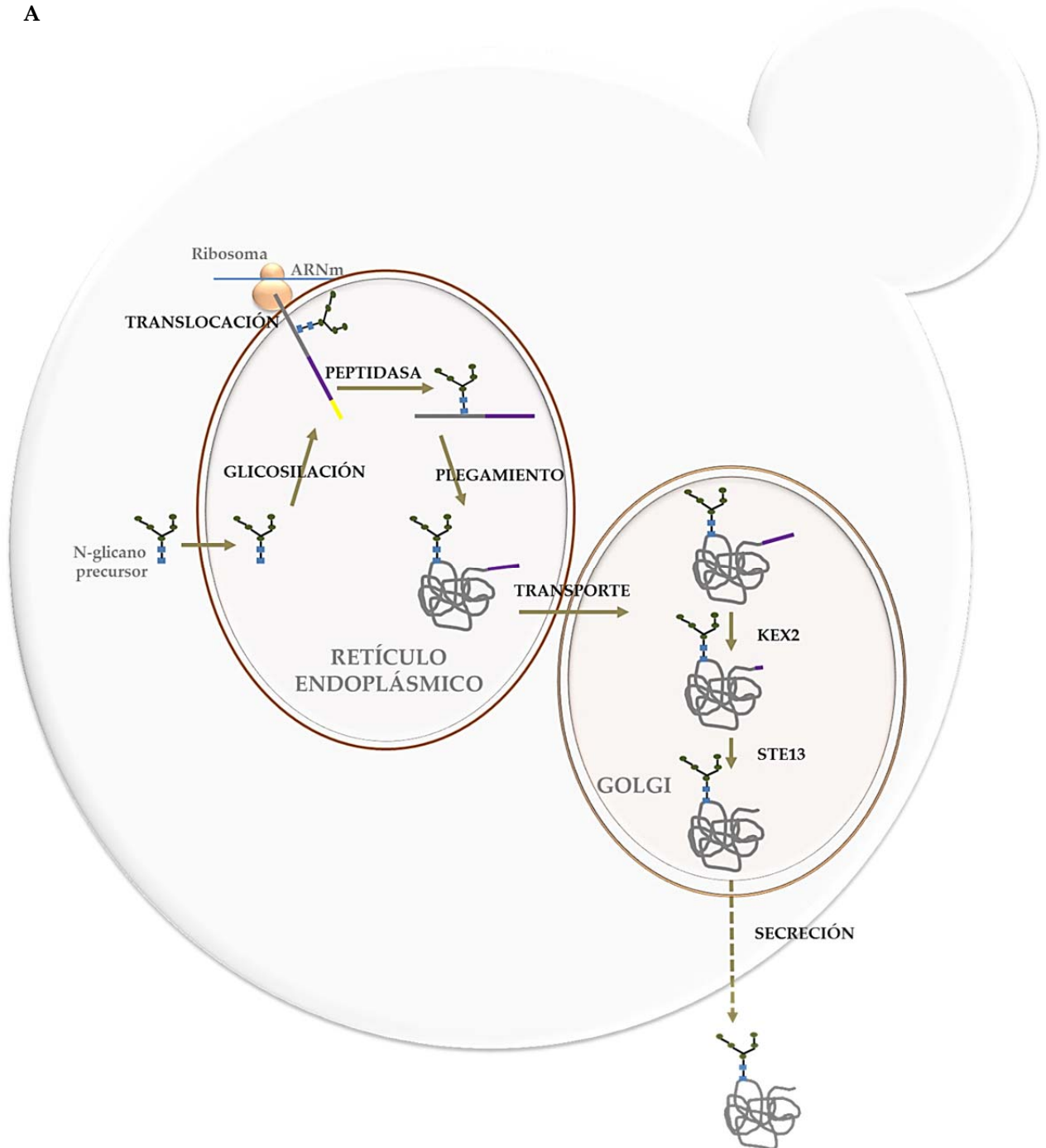
Se puede comprobar que los tres residuos de asparagina de los que se está hablando quedan expuestos al solvente (**figura 3.14**) Concretamente, las Asn350 y Asn358 aparecen en hélices opuestas a las de la posible tapadera; además, esos dos sitios potenciales de glicosilación están muy próximos a la zona de entrada del sustrato hacia el centro catalítico enzimático. Esto significa que estos dos sitios podrían estar interfiriendo con la entrada del sustrato al túnel y la apertura/cierre de una posible tapadera, aunque la desglicosilación de la enzima con Endo H no sugirió tal cosa (**figura 3.16**); aunque siempre queda una molécula de N-glucosamina unida al residuo de asparagina que podría interaccionar como se explicó en la **figura 1.11**. Siempre hay que tener presente que estas cadenas más o menos largas de carbohidratos son en realidad estructuras muy flexibles con lo que habría que considerar cómo su dinamismo afecta a la catálisis de la enzima. El tercer sitio de N-glicosilación (Asn110) no afecta en principio a ninguna zona relacionada con la actividad de la enzima.

Por otra parte, se ha informado de la oxidación parcial de residuos de metionina durante la expresión heteróloga de proteínas en *P. pastoris* (Barral *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2003). El entorno de los peroxisomas en *P. pastoris* es altamente oxidativo y la oxidación de los residuos sensibles podrían ocurrir cuando el peróxido de hidrógeno, producido durante el metabolismo del metanol, se libera de los peroxisomas al medio de cultivo después de una mínima lisis celular (Shapiro *et al.*, 2003). La secuencia de la esteroil esterasa de *O. piceae* contiene 5 residuos de metionina susceptibles de oxidación, uno de ellos, Met413, se encuentra situado en plena región alifática del túnel del sitio de unión del sustrato; mientras que otro, Met63, forma parte de la posible tapadera (**figura 3.17**). Sin embargo, el análisis de aminoácidos de la esteroil esterasa recombinante sugirió que esta no es la razón por la que sus propiedades catalíticas están mejoradas, ya que no se encontraron residuos de metionina sulfona, que es la forma oxidada, (**figura 3.18A**) ni la oxidación intencionada de la enzima nativa con H₂O₂, tratando de emular el ambiente del que se ha hablado, resultó en un considerable aumento de su actividad (**figura 3.20**).

La secreción es el enfoque preferido para la producción de proteínas heterólogas debido a la facilidad de recuperación del producto (Sreekrishna *et al.*, 1997). Además, la proteína recombinante secretada en *P. pastoris* constituye la mayor parte de la proteína total en el medio debido a que la levadura secreta bajos niveles de proteínas endógenas (Lin-Cereghino y Cregg, 2000). Sin embargo, el alto nivel de expresión a partir de pAOX1 puede abrumar a la maquinaria postraduccional de la célula causando una

proteína heteróloga mal procesada (Lin-Cereghino y Cregg, 2000). Este mal procesamiento del prepropéptido del Factor α puede explicarse por la formación de estructuras terciarias durante la expresión de una proteína heteróloga que podrían proteger los sitios de escisión de las proteasas KEX2 y STE13 (Lin-Cereghino y Cregg, 2000) (**figura 4.1A**). Además STE13, que escinde repeticiones EA, es una proteína minoritaria en la célula y no sería capaz de procesar correctamente una proteína sobreexpresada (Brake, 1989). La secuenciación de la región N-terminal de la esterasa de *O. piceae* recombinante dio a conocer un procesamiento incorrecto de la proteína, ya que su extremo N-terminal contenía de 6 a 8 residuos adicionales procedentes de la señal de secreción y el vector empleados (**figura 4.1B**).

A



B

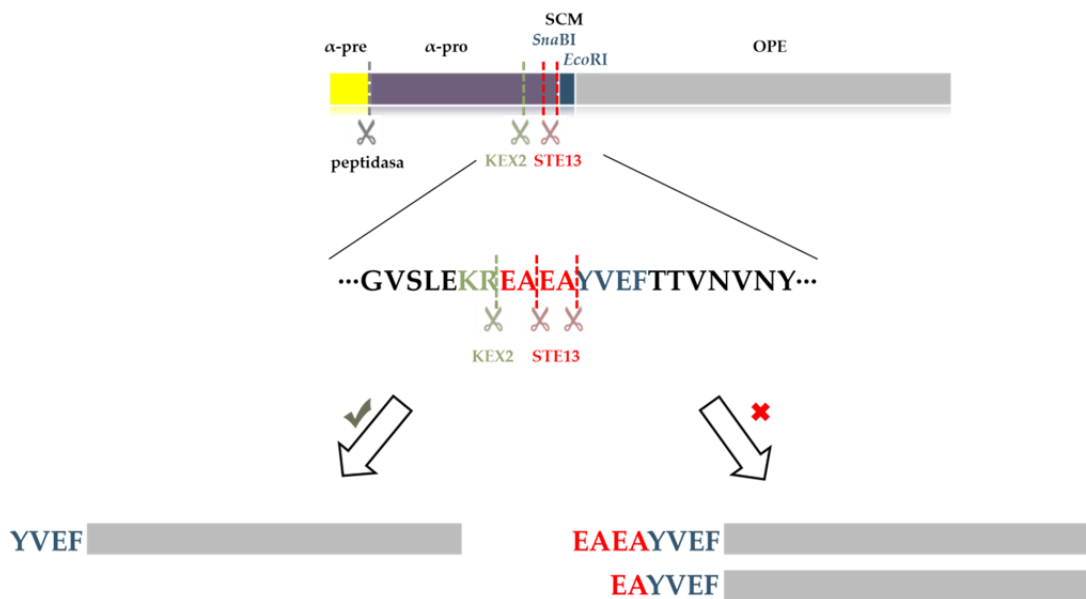


Figura 4.1. Secreción de proteínas con Factor α como secuencia señal de externalización en *Pichia pastoris*. Ruta esquematizada de secreción (A), modificada de De Schutter *et al.*, 2009 y procesamiento del extremo N-terminal de la esteroil esterasa recombinante secretada por *P. pastoris* (B). Se indica el procesamiento hipotético correcto del pre-propéptido del Factor α y el procesamiento real e incorrecto de éste que ha originado las dos formas de OPE*. SCM: Sitio de Clonaje Múltiple.

Esta modificación en el extremo N-terminal parece influir en algunas propiedades de la proteína recombinante, tales como su estado de agregación, como se muestra por ultracentrifugación analítica (figuras 3.21 y 3.22). Mientras que la enzima nativa forma grandes agregados en solución acuosa (Calero-Rueda *et al.*, 2002), tal y como se ha observado con la esteroil esterasa de *M. albomyces* (Kontkanen *et al.*, 2006c) y quizás debido a su alto contenido global en residuos hidrofóbicos (38%) como se ha sugerido para la lipasa BTL1 de *B. thermocatenuatus* (Rúa *et al.*, 1997); la enzima recombinante se mantiene como una mezcla de formas monoméricas y diméricas (incluso a 200 $\mu\text{g/ml}$). Este comportamiento podría ser la razón última responsable de las propiedades catalíticas mejoradas de la enzima recombinante y se descarta, en parte, el papel de la glicosilación en tal comportamiento ya que experimentos de ultracentrifugación analítica con la enzima recombinante desglicosilada confirmaron que ésta se encuentra como una mezcla de especies monómero-dímero (figura 3.21E y F). Un mal procesamiento del Factor α de apareamiento se ha descrito también en otras proteínas expresadas en *P. pastoris*, como la feruloil esterasa de *Talaromyces stipitatus* (Crepin *et al.*, 2003), la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (Damaso *et al.*, 2003), así como las lipasas de *C. antarctica* (Larsen *et al.*, 2008) y *C. parapsilosis* (Brunel *et al.*, 2004), pero las propiedades catalíticas de estas proteínas recombinantes no se vieron afectadas. Este mal procesamiento se ha visto incluso en *S. cerevisiae* (Romanos *et al.*, 1992).

Las esterases y lipasas forman estructuras pseudo-cuaternarias fácilmente en solución acuosa. Las formas multiméricas se han descrito para la esteroil esterasa de *M. albomyces* en ausencia de detergente (Kontkanen *et al.*, 2006c), aunque, a bajas concentraciones, se ha relatado la existencia de formas tetraméricas para la proteína nativa, y estructuras diméricas para la variante recombinante (Kontkanen *et al.*, 2006a; Kontkanen *et al.*, 2006b). Esta tendencia a formar agregados multimoleculares también ha sido observado en la lipasa de *C. parapsilosis* (Brunel *et al.*, 2004) y en las esterases de varias especies de *Streptomyces* (Xiang *et al.*, 2007). Además, la LIP2 recombinante de *C. rugosa*, expresada en *P. pastoris*, se

tradió en una forma agregada, e inactiva de la proteína, y sólo después de un proceso de diaultrafiltración se recuperó la actividad lipolítica (Ferrer *et al.*, 2009). Formas monomoleculares de las lipasas de *C. rugosa*, *Humicola lanuginosa* (sinónimo *T. lanuginosus*) y de *Mucor miehei* se encontraron sólo a bajas concentraciones de enzima y en presencia de detergentes. Por lo tanto, es difícil encontrar sólo la forma monomolecular de enzimas de tipo lipasa, ya que sólo se puede lograr mediante la mezcla de la solución de enzima con un detergente (Palomo *et al.*, 2003).

Las lipasas muestran diferentes propiedades funcionales en sus formas monoméricas o agregadas (Palomo *et al.*, 2003). En general, parece que las formas multimoleculares exhiben una actividad específica más baja y una mayor estabilidad al pH y la temperatura que las proteínas monoméricas, aunque se han publicado datos controvertidos para la lipasa de *C. rugosa* (Liou *et al.*, 1998). En el caso de las enzimas de *M. albomyces* y *Streptomyces sp.* se ve aumentada su actividad en presencia de un detergente, donde las proteínas probablemente tienden a estar en su forma monomolecular (Kontkanen *et al.*, 2006c; Xiang *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso de la estero esterasa de *O. piceae*, no se ha indicado ni la activación ni la inactivación de la enzima (nativa o recombinante) en presencia de Triton X-100 al 0,2% (v/v) (utilizado en la purificación de estas proteínas), aunque por encima de esta concentración se observó una disminución en su actividad (**tabla 3.3**) al igual que ocurre para la lipasa de *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 (Rúa *et al.*, 1997). El uso de Genapol X-100, que es indispensable en las reacciones con la participación de triglicéridos de cadena larga y ésteres de colesterol con el fin de solubilizarlos, es perjudicial para la actividad enzimática sobre pNPB, ya que actúa como un inhibidor competitivo para este sustrato de cadena corta (Calero-Rueda *et al.*, 2002). En cualquier caso, el uso de detergentes favorece la forma monomérica de la proteína (Barba Cedillo *et al.*, 2012).

En relación a lo expuesto anteriormente y de acuerdo con trabajos previos (Palomo *et al.*, 2003), cuando se mantuvo una solución acuosa concentrada de la enzima recombinante durante 16 h a 37°C no se encontró una pérdida significativa de la actividad. Por el contrario, cuando esta solución se diluyó y la solución resultante se incubó en las mismas condiciones, se perdió una cantidad apreciable de la actividad.

Por lo general, un mal procesamiento del Factor α no tiene ningún efecto sobre la actividad de la proteína recombinante, tal y como se ha visto en las lipasas de *G. candidum* (Holmquist *et al.*, 1997), *Yarrowia lipolytica* (Song *et al.*, 2006), y *C. parapsilosis* (Brunel *et al.*, 2004). Anteriormente se había informado de una mejora de las propiedades catalíticas (Mandrich *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2006; Peña-Montes *et al.*, 2009; Sayari *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009) y la estabilidad (Chang *et al.*, 2006b; Lee *et al.*, 2002b) de algunas enzimas recombinantes, especulando sobre la base de diferentes grados de glicosilación, modificación del N-terminal, o sustitución de aminoácidos (debido a un uso de codones preferentes en *P. pastoris* respecto al huésped natural) (Lee *et al.*, 2002b). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis (Barba Cedillo *et al.*, 2012) constituyen el primer informe experimental de una mejora de la solubilidad y constantes cinéticas de la enzima, como consecuencia de su modificación N-terminal. Se ha estudiado la importancia de dicho extremo en la actividad de otras enzimas y se ha llegado a la conclusión de que interactuaría no sólo con el sustrato de naturaleza lipídica sino también con el resto de la molécula de enzima (Frikha *et al.*, 2010).

Se comentó que una explicación sobre la alta tendencia de la proteína nativa a formar agregados podría ser su elevado porcentaje en aminoácidos hidrofóbicos, sin embargo, la modificación del extremo N-terminal de la enzima recombinante, por el tipo de residuos que añade, no parece cambiar esa tendencia general, pues se aumenta en un número de 3-4 el número de residuos hidrofóbicos con respecto a un aumento en 2-3 residuos ácidos y 1 polar según se hable de la forma con 6 u 8 residuos más. Aún así, se favorece que la enzima recombinante esté en forma monomérica-dimérica.

Todo lo referente al estado de agregación de la enzima nativa explicaría por qué no se ha podido cristalizar pues al encontrarse en un estado de agregado multimolecular no precipita, en términos cristalográficos, adecuadamente, entendiéndose, de manera ordenada, impidiendo la formación de cristales. Sin embargo, el uso de la enzima recombinante podría ser decisivo para lograr la estructura tridimensional de la estero esterasa de *O. piceae*.

4.4. ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

Para la selección inicial de transformantes Mut^s no se pudo llevar a cabo un ensayo en placa debido al bajo crecimiento de la levadura en presencia de metanol. No obstante, dicha selección se realizó en medio líquido mínimo (BMM) en ausencia y presencia de sorbitol para favorecer el crecimiento de los transformantes defectivos en la alcohol oxidasa, con vistas al futuro escalado. La selección en presencia de sorbitol no aumentó los niveles de actividad tanto como se esperaba posiblemente por problemas de transferencia de oxígeno tal y como se comentó en la **sección 4.2.1**. Aunque inevitablemente el escalado de cultivos de baja densidad celular en matraz a cultivos de elevada densidad en fermentador de bajo volumen necesitó una reoptimización de las condiciones de cultivo; sin embargo, las condiciones establecidas en un fermentador pequeño normalmente sólo necesitaron ligeros ajustes al escalar a fermentadores de mayor volumen (Lin-Cereghino *et al.*, 2002).

Comparando los resultados obtenidos en bioprocesos en discontinuo con ambas cepas, se comentó que las productividades habían sido más altas con la cepa Mut^s que con la Mut⁺ a pesar de su menor velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}). Un comportamiento similar se encontró en fermentaciones de *P. pastoris* produciendo la lipasa de *R. oryzae* (ROL) pues parece que la expresión y secreción están favorecidas con el fenotipo Mut^s al emplear sorbitol como fuente de carbono adicional que favorece el crecimiento (Ramón *et al.*, 2007). Los resultados mostrados en los cultivos operando en discontinuo están en consonancia con los datos previamente ofrecidos por otros autores (Ramón *et al.*, 2007; Thorpe *et al.*, 1999) que describen que la utilización de sorbitol como una segunda fuente de carbono adicional en cepas Mut^s tiene la ventaja de permitir la inducción de pAOX1 al mismo tiempo que las células muestran tasas de crecimiento incrementadas y una producción de enzima aumentada en comparación con la utilización sólo de metanol del mismo modo que se explicó en la **sección 4.2.2**

Respecto a los procesos en discontinuo alimentado la concentración de metanol tiene que ser fijada para evitar efectos inhibitorios del crecimiento celular (Cos *et al.*, 2006b). De hecho, se ha descrito que la velocidad específica de crecimiento exhibe una cinética de tipo Monod a concentraciones de hasta 3-5 g/L (Kobayashi *et al.*, 2000). Por esta razón, en el caso de la cepa Mut⁺ se seleccionó una concentración de metanol de 3 g/L y para la Mut^s de 2,5 g/L que se establecieron mediante un algoritmo de control de tipo predictivo-PI (Cos *et al.*, 2006a).

En el caso de la cepa Mut⁺ existieron problemas operacionales durante los cultivos en discontinuo alimentado, como el aumento de disipación de calor (Kobayashi *et al.*, 2000) y una gran demanda de oxígeno debido a que el proceso de producción en *P. pastoris* se basa todavía en el de producción de SCP (Curvers *et al.*, 2001b). En cualquier caso, se alcanzó una tasa específica de crecimiento que se mantuvo constante de unos 0,035 h⁻¹ (**figura 4.2A**). Como ya se comentó en la sección de resultados, este valor es más bajo que el que se alcanzó con los procesos en discontinuo, esto se podría explicar por el tipo de medio empleado (MSB de Invitrogen) y por la propia estrategia operacional. Asimismo, durante la producción de ROL empleando el mismo medio y estrategia se observó un comportamiento similar, aunque la tasa específica de crecimiento a este *set point* de metanol fue un poco mayor (0,046 h⁻¹), indicando la influencia de la producción de la proteína heteróloga sobre la velocidad específica de crecimiento de la levadura (Barrigon *et al.*, 2013). Aún con eso, la producción de OPE^{*} fue mayor en términos de actividad total y productividad volumétrica (4 veces más).

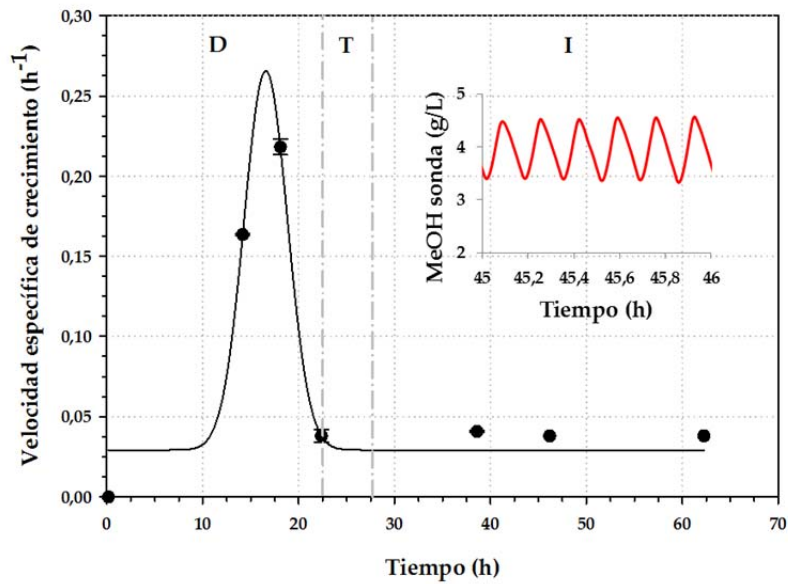
Las cepas Mut⁺ suelen ser bastante sensibles a altas concentraciones de metanol residual y una acumulación repentina de metanol podría reducir la actividad AOX e incluso ser tóxica provocando muerte celular. De ahí que haya que controlar cuidadosamente la concentración de metanol. En el caso de que haya ocurrido una acumulación de metanol y exista limitación de oxígeno no se debe aumentar la tasa de aireación porque la combinación de altas concentraciones de metanol y oxígeno causa un aumento en la tasa de producción de formaldehído que es muy tóxico y provoca muerte celular, en estos casos lo mejor es parar la bomba de metanol hasta que haya sido consumido. En el caso de cepas Mut^s no se puede usar la señal DOT para monitorizar indirectamente el metanol porque la actividad AOX es más limitante que el

metanol, por lo que esta cepa no es tan sensible a altas concentraciones de metanol como la Mut⁺ debido a su baja utilización del metanol, aunque si el metanol excede el límite crítico los cultivos van a estar limitados por el oxígeno (Jahic, 2003).

Debido a los problemas operacionales comentados con la cepa de fenotipo Mut⁺, ya conocidos de otros casos, es por lo que se optó por usar también una cepa Mut^s en una estrategia con sustrato mixto (sorbitol como co-sustrato). Se seleccionó la concentración de metanol y la velocidad específica de crecimiento a la que se quería crecer la levadura durante la fase de inducción, concretamente a 0,02 h⁻¹, pues se habían visto buenos resultados con ROL a ese valor (Arnau *et al.*, 2010). En este caso no se observaron problemas de temperatura aunque fue necesario suministrar una mezcla de aire/oxígeno puro para mantener el oxígeno disuelto por encima del 20%. Asumiendo que la entalpía de combustión del sorbitol es cercana a la del manitol (-507,8 KJ C⁻¹mol⁻¹), que representa el 69% de la entalpía de combustión del metanol (Arnau *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta la baja tasa de consumo de metanol de esta cepa, se necesitó menos demanda de oxígeno y se generó menos calor. Bajo estas condiciones la contribución del consumo de metanol al crecimiento es mínima siendo el sorbitol la principal fuente que sostiene el crecimiento de *P. pastoris*. Esto también hizo que el control de la concentración de metanol fuese mejor implementada que con la cepa Mut⁺. Además, la implementación de la adición exponencial de sorbitol fue efectiva pues la tasa media real de crecimiento fue de 0,018 h⁻¹ (**figura 4.2B**). La cantidad residual de sorbitol en el medio durante el cultivo fue inferior a 1 g/L y no afectó a la producción de la enzima recombinante ni al crecimiento pues se han descrito efectos inhibitorios de este a partir de una concentración de 50 g/L (Jungo *et al.*, 2007). Esto supone que la presencia de pequeñas cantidades residuales de sorbitol es menos problemática que de glicerol y supone una ventaja frente a otros posibles co-sustratos. Aunque la tasa específica de crecimiento en glicerol es mayor que con sorbitol, y consecuentemente se debería obtener una mayor productividad, se ha demostrado que programar una adición exponencial de glicerol mayor de 0,03 h⁻¹ disminuye los niveles extracelulares de proteína recombinante (Arnau *et al.*, 2011). De nuevo, se obtuvieron mayor actividad total y productividad volumétrica que en el bioproceso en discontinuo aunque Y_{PX} y la productividad específica fueron 2,2 y 3,7 veces más bajas respectivamente, debido, probablemente, al empleo de un medio menos rico en nutrientes. La concentración de metanol se mantuvo por debajo del *set point* de 2,5 g/L, con oscilaciones menores de 0,6 g/L, mostrando el buen desarrollo del algoritmo de control implementado. Aunque la tasa específica de crecimiento fue menor para Mut^s en discontinuo alimentado, el resto de parámetros del cultivo fueron más altos por lo que las ventajas del uso de sorbitol en bioprosos en discontinuo fueron corroboradas en discontinuo alimentado. Por tanto, la cepa Mut^s permitió un control de la concentración de metanol considerablemente mejor respecto a Mut⁺ debido a su tasa específica de consumo de metanol más baja (Çelik *et al.*, 2009).

-Discusión-

A



B

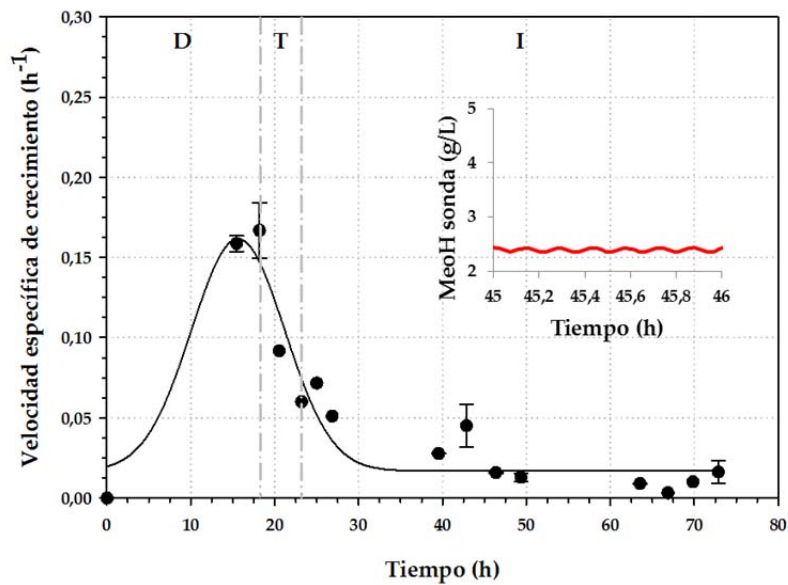


Figura 4.2. Velocidad específica de crecimiento en procesos operando en discontinuo alimentado. Cepa Mut^+ (A) y cepa Mut^- (B). Los datos representan la media de los valores experimentales y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los datos se ajustaron con el programa SigmaPlot 11.0. Los gráficos interiores representan la medida a tiempo real de la concentración de metanol por la sonda al efecto. Nótese que las oscilaciones son mayores con la cepa Mut^+ que con la cepa deficiente en el gen *aox1*.

Los dos problemas principales de los bioprocesos en discontinuo alimentado estándar son la represión por catabolito y la proteólisis (Jahic, 2003): respecto al primero, Cregg *et al.* (Cregg y Madden, 1988) realizaron observaciones que apoyan el hecho de que pAOX1 es reprimido por catabolito durante el

crecimiento de cepas Mut⁺ en metanol a una tasa de crecimiento no limitante. Se puede ver cómo pronto tras la inducción la actividad AOX aumenta hasta 4-5 veces con respecto a la última parte del cultivo, la represión se muestra también cuando *P. pastoris* es crecida en metanol en condiciones limitantes (tasa crecimiento en metanol limitante) y la actividad AOX es mayor. En el caso de la cepa Mut^s, que presenta una tasa de crecimiento en metanol más baja, al bajar la tasa de utilización de metanol se intenta bajar la represión de pAOX1. En relación a la proteólisis ha de indicarse que en el año 2002 todavía no se habían documentado proteasas extracelulares, los principales problemas que provoca son los siguientes: i) reducción del rendimiento cuando la proteína recombinante es degradada por completo, ii) pérdida de su actividad biológica cuando es truncada y iii) contaminación del producto con intermediarios de degradación en el procesamiento ulterior debido a sus características fisicoquímicas y/o afinidades similares. Aunque se podrían utilizar cepas deficientes en proteasas para paliar estos problemas, la realidad es que son más difíciles de transformar y presentan una menor tasa de crecimiento y viabilidad. Otra alternativa es disminuir la temperatura de cultivo teniendo en cuenta que es sólo durante la fase en discontinuo con glicerol cuando se utiliza la tasa de crecimiento máximo, al principio de la fase de inducción la tasa de crecimiento está limitada por la actividad AOX y por tanto por la demanda de oxígeno lo que fuerza que el proceso se realice con limitación por metanol por lo que en algunos casos en esta etapa se puede disminuir la temperatura sin disminuir la tasa de crecimiento.

A lo anterior hay que añadir el problema de usar el medio MBS-Invitrogen desarrollado por la *Phillips Petroleum Company* en los años setenta por la tendencia que presentan algunas sales del medio a precipitar durante su preparación por lo que la verdadera concentración de algunos minerales en el medio es difícil de conocer y la turbidez causada por las sales dificulta la medida de las densidades celulares. Estos problemas se han tratado de atajar reduciendo cuatro veces la concentración de sales en la receta original del medio sin afectar al crecimiento ni a la producción (Lin-Cereghino *et al.*, 2002).

Para mejorar los rendimientos se han descrito distintas alternativas como acortar los tiempos de inducción, trabajar a temperaturas bajas, o la adición de determinadas sustancias como detergentes (Lin-Cereghino *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la producción y secreción de OPE* está favorecida en la cepa Mut^s, igual que ocurre con ROL (Cos *et al.*, 2005) y como se puede apreciar en la **figura 3.26** no se detectaron problemas de proteólisis ni durante ni una vez finalizados los bioprocesos. Hay que hacer constar que la producción de proteínas recombinantes representa un incremento en la demanda energética de la célula hospedadora a la hora de enfrentarse a su síntesis, ensamblaje, modificaciones postraduccionales y secreción (Dragosits *et al.*, 2009). Así que, como ya se había mencionado por otros autores (Ramón *et al.*, 2007), es posible que la sobreexpresión de proteínas heterólogas cause menos estrés a la cepa Mut^s por su propia fisiología y por la estrategia de adición de un co-sustrato. A la vista de estos resultados la cepa Mut^s puede considerarse como la mejor cepa para la producción de la esterol esterasa recombinante desde un punto de vista operacional y económico.

Existen pocos estudios fisiológicos que muestren el impacto de la producción de proteínas recombinantes sobre el metabolismo de la levadura. Las rutas de reacciones bioquímicas de *P. pastoris* son iguales a las de *S. cerevisiae*. Durante la producción de proteína heterólogas en *P. pastoris* existe una redistribución de los flujos metabólicos para favorecer la síntesis proteica. Los datos sugieren que la levadura compensa las fuentes adicionales requeridas para la producción de proteínas recombinantes mediante la redirección de flujos intracelulares probablemente para incrementar el aporte de energía. Al menos, usando glucosa como sustrato en discontinuo se ve que la biomasa de una cepa recombinante es mayor que la de una cepa de referencia debido a un incremento del flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato y por otro lado se ha visto un aumento del ciclo TCA y por ello de la tasa respiratoria con aumento de ATP y NADH para paliar el colapso metabólico causado por la síntesis de una proteína recombinante. En los cultivos operando en discontinuo alimentado vuelve a existir una correlación entre la biomasa generada y la ruta de las pentosas pero como se obtiene una menor biomasa se sospecha que puede ser por el gasto energético para compensar el colapso metabólico; y de hecho, hay un mayor flujo a través del ciclo

-Discusión-

TCA. Hoy en día se encuentra bastante bien establecido que la producción de proteínas heterólogas está conectada con diferentes estreses celulares. El estrés celular se manifiesta en mayores necesidades de energía para la síntesis de proteínas recombinantes y causa un colapso metabólico que se caracteriza por una inhibición del crecimiento o un bajo nivel de acumulación del producto, disminuye la resistencia de las células a las influencias ambientales o incluso favorece la lisis celular, o la inestabilidad plasmídica; y por ello, influye en la productividad. A nivel molecular se trataría de una combinación de los procesos de elevada transcripción del gen de interés, plegado y secreción de la proteína recombinante, y una elevada degradación proteica (Heyland *et al.*, 2010).

No hay duda, en términos de producción total, que los bioprocesos en discontinuo alimentado son la mejor estrategia operacional (por encima de los discontinuos y de las producciones en Erlenmeyer). Claramente, la producción en condiciones no controladas en Erlenmeyer influye negativamente en el $Y_{P/X}$ (**figura 3.27B**), este efecto negativo parece ser algo mayor con la cepa Mut^s; quizás debido a problemas de transferencia de oxígeno a esta escala como ya se comentara previamente. El uso de medios ricos o complejos en discontinuo alimentado no se consideró para mantener la economía del proceso con fines industriales. El hecho de que la enzima secretada con la cepa Mut^s sea el 50% de la proteína presente en el crudo es importante dado que los costes del procesamiento ulterior pueden suponer hasta el 50% de los costes totales de manufacturación del producto (Shuler y Kargi, 2002). Cuando se comparó el efecto del escalado en ambas cepas en términos de $Y_{P/X}$ se observó que este era mayor en procesos en discontinuo que en discontinuo alimentado para la cepa Mut^s, probablemente, el uso de un medio de cultivo más rico en nutrientes podría compensar la baja tasa de consumo de metanol debido a la delección del gen *aox1*, que supone el 85% de la producción de alcohol oxidasa (Krainer *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que la tecnología analítica de procesos no sólo permite la optimización de los bioprocesos para la producción de una proteína recombinante en un modo reproducible; sino que también, al ser un estudio racional, disminuye los costes económicos y los tiempos de producción lo que es primordial desde un punto de vista industrial. En este sentido, el control de los parámetros como la tasa de adición de sustrato y de metanol han sido claves en la producción en biorreactor de altos niveles de la esterasa y de una forma reproducible.

4.5. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS ENZIMAS DE *O. piceae*

4.5.1. Reducción de los problemas de *stickies* durante la producción de papel reciclado. Desacetilación de PVAc

A diferencia de otros trabajos (Sivalingam *et al.*, 2003) donde la hidrólisis del PVAc se llevó a cabo a altas temperaturas, en un disolvente orgánico y catalizada por lipasas dedicadas a otras aplicaciones biotecnológicas (como Novozym 435 y la lipasa de *C. rugosa*), en el contexto de esta tesis las reacciones se desarrollaron a 28 °C en una dispersión acuosa del polímero y se usaron enzimas especialmente comercializadas, e incluso patentadas, para el biocontrol de *stickies*.

Las enzimas de *O. Piceae* y Optizyme® 530 mostraron los niveles más altos de actividad. La mayor actividad que mostró la enzima recombinante de *O. piceae* respecto a la nativa está de acuerdo con los resultados obtenidos previamente sobre triglicéridos y ésteres de esteroles gracias a las propiedades cinéticas mejoradas de la enzima (Barba Cedillo *et al.*, 2012). Cabe destacar que, al igual que las enzimas de *O. piceae*, Optizyme® 530 retuvo su actividad cuando se añadió a la reacción Genapol X-100 al 1% (v/v). Esto es interesante porque cuando en otros trabajos (Calero-Rueda *et al.*, 2009) se han comparado diversas enzimas, de orígenes distintos, con la enzima producida por *O. piceae* en presencia del tensioactivo, mostraron bajas actividades. Optizyme® 530 se describe como una esterasa de *M. grisea* expresada en *A. oryzae* (Ryu *et al.*, 2008) y dadas sus características podría tratarse de la que identifican como lipasa 4 (MGL4) en la base de datos del genoma de *M. grisea* con la que la enzima de *O. piceae* guarda una buena identidad de secuencia del 54,75% (**figura 4.3A**) siendo los residuos que comparten los conservados en este tipo de enzimas. Esta proteína se ha modelado en base a la estructura de la LIP3 de *C. rugosa* (**figura 4.3B**)

-Esterasa versátil-

presentando una estructura tridimensional semejante a OPE, incluso la posible tapadera estaría constituida por dos hélices como ocurre con esta última a diferencia de las enzimas de *C. rugosa* que muestran una única hélice más larga (Calero-Rueda *et al.*, 2009). Sin embargo, a excepción de los residuos de la triada catalítica, los residuos del túnel son muy diferentes, lo que podría explicar la baja actividad de esta enzima, en las condiciones ensayadas, sobre oleato de colesterilo. Además, el modelado de la proteína ha permitido saber que su sitio de unión al sustrato es semejante al de la acetilcolinesterasa de *T. californica* (figura 4.3C y D), lo cual no resulta extraño dada la similitud de esta última con las distintas isoenzimas de *C. rugosa* tal y como se mencionó en la introducción. Esto podría explicar su buena actividad frente a PVAc y no frente a ésteres de colesterol. En las figuras 4.3C y D se puede observar el centro activo de la enzima ocupado por el inhibidor (1R)-1,2,2,-trimetilpropil (S)-metilfosfinato o GD8.

A

OPETTVNVNY	PEG..EVVGV	SVLG.IESFR	24
MGL4	QVIRQQLPV	DPRLPQLDLS	RFEVPIDLRE	PEDGLKLEAR	SVLADVESFK 50
OPE	GVPFAQPPVG	NLRKPPVRY	TENIGTKDIT	.GIGPSCPQM	YLSTGNCELL 73
MGL4	GIPFAEPPLG	DLRMRPPVRL	EKPLGKFDA	MRISPQCPQM	FFSSSTGRML 100
OPE	FQLVGNLINI	PLFQTATLS	EDCLTLNIQR	PAGTTS	SSL PVLFWIFGGG 123
MGL4	TQVIGNLLNK	GLFQKILDST	EDCLNINVQR	PKGKAGDKL	PVLFWIFGGG 150
OPE	FELGTNQYYD	GIDLLTEGIS	LGEPIFIVAI	NYRVGGFGFL	GGKEIKADGS 173
MGL4	FELGSNAMYS	GTPILTRAME	QGQPFIFVGV	NYRVGGFGFM	PGEIQAEGS 200
OPE	SNLGLLDQRI	ALEWVADNIA	SFGGDPKVT	IWGESAGSIS	VFDQMALYGG 223
MGL4	GNAGLLDQRM	GMEWVADNIE	AFGGDPKVT	IWGESAGAIS	VFDQMALYDG 250
OPE	NNKYKGKALF	RGGIMNSGSV	VPAAPVDGVK	AQAIYDHVVS	EAGCAGTSDT 273
MGL4	NATYKGKPLF	RAAIMNSGSI	IPADPVDCKP	GREVYNQVVK	AGGCSGRSDT 300
OPE	LACLRTVDYT	KFLTAVNSVP	GIVSYSSIAL	SYLPRPDGVV	LIDSPREEIVK 323
MGL4	LKCLRELPEY	KFLKAANAPP	GLLSYNSVAL	SYLPRPDGKV	LRASPDVLLL 350
OPE	NKQYAAVPMI	IGDQDEGTL	FAVLPMITS	TAKIVQYFQD	LYFYATKEQ 373
MGL4	GQRYYPVPMI	IGDQDEGSI	FALFQHILTN	TEMLVGYLKE	IFFPATDIQK 400
OPE	LTAFVNTYPT	DITAGSPFNT	GIFNELYPGF	KRLAAILGDM	TFTLARRAFL 423
MGL4	IKDLVKSYPD	DPREGSPFRT	GKLNQVYPQF	KRLAAILGDI	TFTLTRRLFL 450
OPE	QLCSEVNPDV	PSWSYLASYD	YGFPFLGTFH	ATDILQVFG	VLPNYASGSI 473
MGL4	FASATLHPDV	PSWSYLSSYD	YGTPIAGTFH	GSDLLQVFG	ILPNYASRTT 500
OPE	QKYYINFVTT	GDPNKGAADV	IQWPQWSAKK	NILQIYATKA	VIVADNFRK 523
MGL4	VSYYTNFLYN	LDPNEGIVQ	.HWPKWENQ	ELLMNANDA	KLIPDNFRNE 549
OPE	SYEYLYNNIG	IFRI			537
MGL4	SYNYLLANFL	SFYI			563

-Discusión-

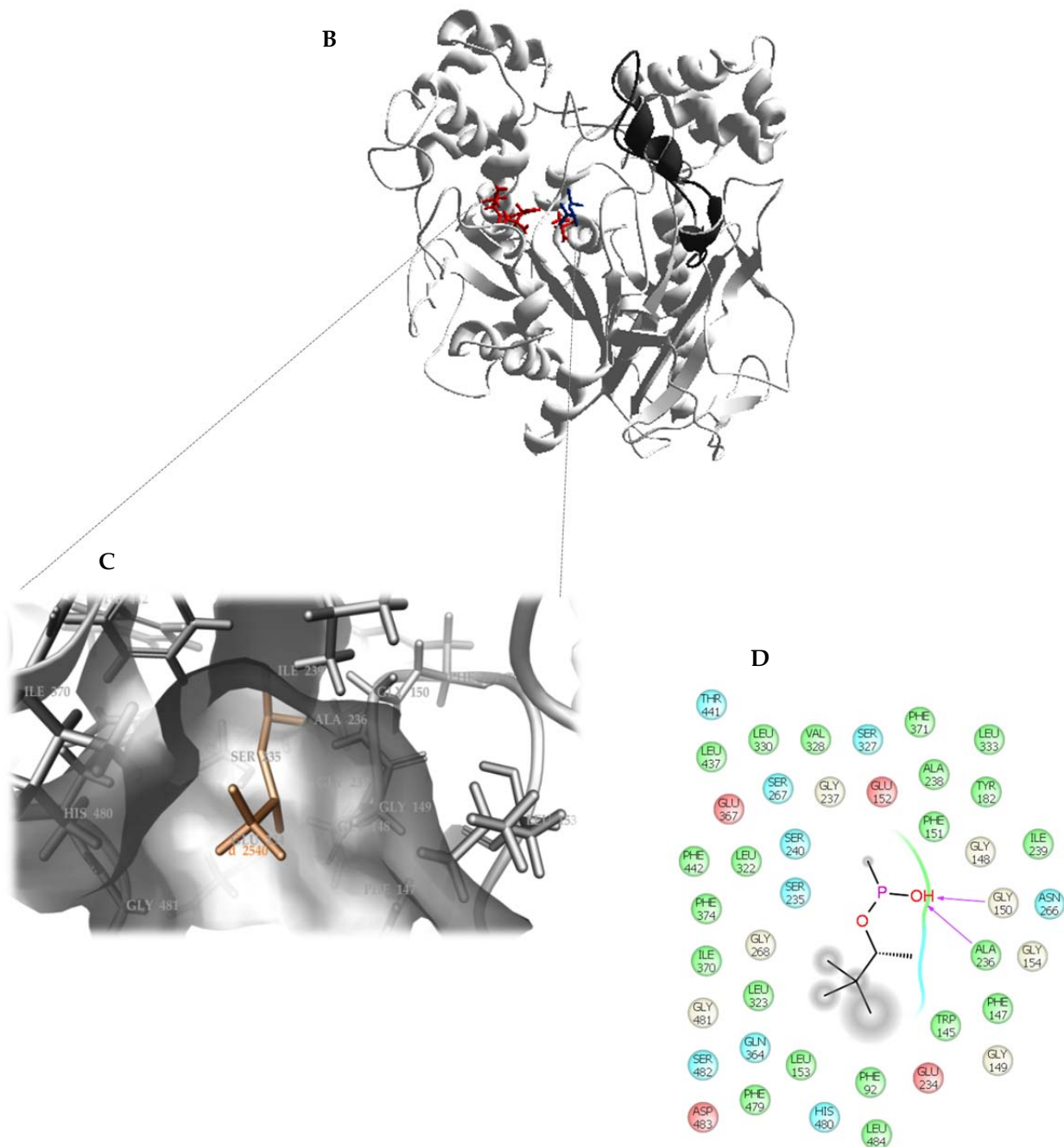


Figura 4.3. Comparación de la esteroles esterasa de *O. piceae* con la esterasa de *M. grisea*. Alineamiento de las secuencias maduras de aminoácidos de la esteroles esterasa de *O. piceae* (entrada Gene Bank AY899847) y la esterasa de *M. grisea* (Broad Institute *M. grisea* database) (A). El péptido señal de MGL4 se identificó con el programa SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011). Se muestran los residuos catalíticos rotulados en rojo, los residuos de la posible tapadera en azul oscuro, los sitios de N-glicosilación rotulados en verde, los puentes salinos en azul claro y los puentes de hidrógeno en rosa. Las secuencias consenso están subrayadas y los residuos coincidentes en el alineamiento en negrita. El alineamiento se hizo con el programa MUSCLE (EBI). Modelado de la esterasa de *M. grisea* (B). Modelo generado con *spdbviewer*. En rojo se representan los residuos de la triada catalítica, en azul el sustrato GD8 y en negro los residuos de la posible tapadera. El pdb se obtuvo a partir del programa I-TASSER. En detalle se muestra el centro activo de la enzima con el sustrato GD8, en bronce, (C) modelado con el programa Maestro v9.3.5 (Schrödinger), obsérvese como el sustrato queda dentro de un túnel. La interacción entre los residuos del centro activo y el sustrato se muestra en el diagrama obtenido con Maestro (D). Las flechas indican puentes de hidrógeno entre residuos de la proteína-agua-sustrato.

4.5.2. Síntesis de ésteres de esteroides como nutraceuticos

Hoy en día, mientras que muchos de los procesos desarrollados en la industria alimentaria están completamente establecidos y son claros ejemplos de biotecnología blanca, nuevos procesos biotecnológicos innovadores se están estudiando en otras industrias para reducir el uso de recursos fósiles o evitar reacciones químicas específicas con alto impacto ambiental. El uso de enzimas, catalizadores naturales, en la industria es un claro ejemplo de biotecnología blanca. Las lipasas son una de las enzimas más importantes para fines biotecnológicos debido a su capacidad para trabajar tanto en sistemas acuosos y orgánicos, y catalizar reacciones en nuevos sistemas tales como fluidos supercríticos y líquidos iónicos.

Las esterasas esteroles comparten con las lipasas su capacidad para catalizar algunas reacciones en este tipo de sistemas y, a veces, no es fácil distinguirlas entre sí. De hecho, aunque algunas lipasas comerciales no son capaces de hidrolizar los ésteres de esteroles, hay controversia en la clasificación de algunas de ellas que tienen pequeñas diferencias en su afinidad por sustratos comunes con esteroles esterasas.

No existen muchas esteroles esterasas microbianas descritas pero unas de las más conocidas son las isoformas LIP2 y LIP3 producidas por la levadura *C. rugosa* (Benjamin y Pandey, 1998; Chang *et al.*, 2006b; Domínguez de María *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2009; López *et al.*, 2004; Tenkanen *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2010). De hecho, existen crudos enzimáticos comercializados por Sigma (lipasa tipo VII de *C. rugosa*) y Amano (Lipasa AY, Amano 30) con actividad LIP3 que se han empleado en varias ocasiones para la síntesis de diferentes compuestos (Bezbradica *et al.*, 2006; Kim y Akoh, 2007). En realidad, hay preparaciones comerciales que contienen esas proteínas con otra llamada LIP1 (comúnmente reconocida como lipasa) cuya afinidad es mayor para sustratos típicos de lipasa. La enzima de *O. piceae* tiene una identidad de secuencia del 40% con estas tres lipasas de *C. rugosa*, pero es más parecida a LIP2, la enzima con mayor actividad sobre ésteres de esteroles, en el sitio de unión de sustrato (Calero-Rueda *et al.*, 2009). También se han empleado otros crudos enzimáticos del hongo *Aspergillus*, poco caracterizados, para la síntesis de ésteres de fitoesteroides (Töke *et al.*, 2007) aunque la productividad fue escasa y se requirieron largos tiempos de incubación. Además, se ha descrito una enzima del hongo *Trichoderma sp.* AS59 capaz de sintetizar ésteres de esteroides aunque poco se menciona sobre ello en el trabajo publicado (Maeda *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que los ésteres de fitoesteroles pueden reducir el colesterol LDL mejor que los fitoesteroides libres porque estos compuestos presentan una mayor solubilidad lo que es muy conveniente para ser incorporados en la alimentación diaria (Weber *et al.*, 2002). Las lipasas y esteroles esterasas pueden catalizar procesos de esterificación directa, como la enzima de *C. rugosa* que para la síntesis de esta clase de compuestos, las reacciones se desarrollan a temperaturas de entre 30 y 60 °C, con tiempos de reacción de entre 24 y 72 horas obteniendo rendimientos que oscilan entre el 40 y el 90%, aunque estos resultados dependen del donador de grupos acilo, del tipo de solvente empleado y de la presencia o no de agua en el medio de reacción (Norinobu *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2011; Villeneuve *et al.*, 2005; Vu *et al.*, 2004) ; o reacciones de transesterificación, donde se emplean lipasas comerciales, en presencia de estabilizantes y/o inmovilizadas, y a altas temperaturas de reacción (60 °C) (Basheer y Plat, 2004) . Las preparaciones comerciales que contienen una mezcla de diferentes isoenzimas de *C. rugosa*, que muestran actividad de la lipasa y esteroles esterasa, se han utilizado como biocatalizadores para la síntesis de muchos compuestos de interés industrial. Su capacidad para producir ésteres de fitoesteroles por esterificación directa y la transesterificación se ha demostrado (Villeneuve *et al.*, 2005). Además, en la patente US 6.087.353 (Stewart *et al.*, 2000) se describe la posibilidad de hidrogenar los ésteres de fitoesteroides con el fin de mejorar aún más su solubilidad y estabilidad para poder incorporarlos a diversos tipos de productos (bebidas, alimentos, nutraceuticos, etc.). Cabe destacar que los rendimientos obtenidos con preparados enzimáticos de *C. rugosa* en la producción de estos compuestos mediante reacciones de acilación directa son más altos que en reacciones de esterificación (Villeneuve *et al.*, 2005)

-Discusión-

Es importante resaltar que algunas enzimas de tipo lipasa, aunque pueden realizar reacciones directas de esterificación, realizan la síntesis de ésteres de esteroides preferiblemente mediante reacciones de transesterificación de los sustratos ya que las moléculas de fitoesterol, debido a fuertes impedimentos estéricos, son sustratos difíciles de acilar para ellas directamente (Kirk y Christensen, 2002).

El porcentaje de esterificación depende de la relación fitoesteroides:ácido graso; de modo que, un exceso de éste último incrementa la síntesis del éster. Utilizar un exceso de uno de los sustratos es una estrategia recurrente en este tipo de reacciones para optimizar los rendimientos; a pesar de que reacciones en las que los sustratos aparezcan en una relación 1:1 puedan parecer ideales desde un punto de vista económico e incluso para la posterior purificación de los productos, en determinadas ocasiones, resulta ventajoso tal exceso pues reduce el tiempo de reacción necesario para obtener altos porcentajes de acilación (Villeneuve *et al.*, 2005).

Además, el disolvente usado en la reacción es un parámetro crítico que puede modificar el rendimiento de ésta como consecuencia de su diferente polaridad, lo cual determina la actividad “esterificante” de lipasas y esteroles esterases (Grodowska y Parczewski, 2010; Hirata *et al.*, 1990). Incluso mediante la llamada ingeniería de solventes se pueden producir cambios en la actividad catalítica, estabilidad y selectividad de la enzima sin necesidad de modificarla mediante técnicas de mutagénesis, evolución dirigida o *phage display* (Klibanov, 2001). En este trabajo, se probaron tres disolventes diferentes, pero el isooctano resultó ser un poco mejor que el n-hexano y tolueno para cualquiera de las tres enzimas ensayadas tanto en sistemas bifásicos como monofásicos. Estos tres solventes se han empleado para la síntesis de otros compuestos de interés y continúan hoy en día empleándose en la industria farmacéutica bajo estrictas normas de seguridad (Grodowska y Parczewski, 2010). De hecho, el tolueno, en el año 2005, ocupaba el puesto número siete dentro de la lista de los diez solventes más usados en *GlaxoSmithKline Pharmaceuticals* (Constable *et al.*, 2007); mientras que el n-hexano es uno de los pocos solventes orgánicos aceptados en la industria alimentaria (Li *et al.*, 2010). Todos ellos presentan una adecuada separabilidad agua/solvente cuando se emplean en sistemas bifásicos (Constable *et al.*, 2007). El empleo de isooctano o n-hexano, solventes con alto valor de coeficiente de partición (logP) resulta óptimo por tanto, según los datos obtenidos, desde el punto de vista catalítico y ambiental comparado con el tolueno; además, el uso de sistemas bifásicos resulta en altos porcentajes de acilación y son preferibles a los monofásicos en lo que se refiere a perspectivas de futuro, además este tipo de sistemas resultan atractivos desde un punto de vista industrial pues hacen que los procesos de separación y recuperación sean mucho más eficientes y demanden menos energía. De hecho, se ha llegado a estimar que hasta un 50% del gasto energético necesario para un proceso químico proviene de la purificación de los productos, y por tanto, del reciclado, vía destilación, por ejemplo, para la reutilización de los solventes empleados (Clark y Tavener, 2007).

Existen otras fuentes de fitoesteroides, aparte de los esteroides de soja comerciales usados, que se podrían emplear en este tipo de reacciones como los residuos industriales y agrícolas (Stewart *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que las esteroles esterases nativa y recombinante de *O. piceae* pueden catalizar eficazmente la esterificación de fitoesteroides de soja con ácido láurico como donador del grupo acilo de una manera similar a una preparación comercial de *C. rugosa* en las mismas condiciones ensayadas. Además los crudos liofilizados usados para el estudio han mostrado una gran estabilidad a lo largo del tiempo de conservación, siendo estables al proceso de liofilización, conservando una actividad media tras ello del 80% para la enzima nativa y de 70-100% para la enzima recombinante, según el lote y medio de producción; además, los liofilos se mantuvieron estables a 4 °C durante más de 6 meses sin perder apenas actividad. Las reacciones de acilación enzimática que se han desarrollado se caracterizan por desarrollarse a bajas temperaturas, con el consiguiente ahorro de energía, a una alta agitación magnética para eliminar barreras de transferencia de masa para los sustratos (Klibanov, 2001) y en tiempos cortos de reacción (se alcanzaron rendimientos entorno al 50% en 4h), dependiendo de la enzima y el solvente. Considerando los resultados expuestos en los trabajos y patentes mencionados, las principales características diferenciadoras de los resultados expuestos en esta tesis serían la capacidad de la esteroles esterase del hongo *Ophiostoma piceae* (nativa y recombinante) de catalizar con alto rendimiento (90%) reacciones directas de acilación de

fitoesteroles, en presencia de diferentes solventes orgánicos, en presencia y/o ausencia de agua (con la excepción de la enzima recombinante), a una temperatura de 28°C, en tiempos cortos de reacción de 4-24 horas, y empleando cantidades del orden de miligramos de crudos liofilizados sin ningún tipo de proceso previo de estabilización y/o inmovilización en los que la enzima utilizada es la única con actividad esterol esterasa, a diferencia de lo que ocurre en las preparaciones comerciales de *C. rugosa*, que contienen una mezcla de diferentes isoenzimas con diferentes especificidades como se ha comentado. Precisamente, debido a la dificultad existente para separar mediante técnicas cromatográficas estas isoenzimas de *C. rugosa*, sería aconsejable obtener las diferentes variantes recombinantes para su aplicación industrial. Sin embargo, a diferencia de *O. piceae*, *C. rugosa* hace un uso no universal del código genético y esto dificulta la expresión de enzimas de esta levadura en sistemas de expresión heteróloga (Brocca *et al.*, 1998).

En el caso de la enzima recombinante se observó una nula actividad en sistemas monofásicos siendo imprescindible la presencia de agua en la reacción para promover la actividad enzimática como se ha visto en otros casos (Cárdenas *et al.*, 2001). Este hecho podría explicarse en base a su estado de agregación ya que al ser menor que el de la nativa, y posiblemente el de la comercial, se encontraría más expuesta al solvente lo que influiría en su actividad. También habría que considerar el grado de solvatación de la enzima para explicar los resultados obtenidos. La **figura 4.4** trata de esquematizar estas hipótesis sobre cómo influirían ambos factores en la actividad de la enzima según el tipo de sistema ensayado. En relación al empleo de ciclodextrinas, se emplearon para llevar a cabo un proceso de *molecular imprinting* con la enzima recombinante buscando la mejora de los resultados obtenidos en sistemas monofásicos. Se escogió como solvente tolueno porque en el caso de funcionar la enzima en estas condiciones se demostraría la idoneidad de las ciclodextrinas para mejorarla y porque previamente en otros trabajos se había comprobado como el rendimiento final de la reacción era mejor con este solvente orgánico que con otros ensayados. Sin embargo, los resultados logrados no fueron satisfactorios pues la enzima permaneció inactiva durante el tiempo de las reacciones. En algunos trabajos se ha comprobado que los compuestos macrocíclicos del tipo ciclodextrinas y éteres de corona podrían bloquear el sitio activo de la lipasa de *C. rugosa*; de modo que, en función del tamaño molecular de la ciclodextrina usada así sería el porcentaje de inhibición (Mine *et al.*, 2003), y dada la similitud, ya comentada, entre estas enzimas, esto podría estar pasando con la enzima recombinante de *O. piceae*. Para demostrar este punto, se realizaron con la enzima nativa ensayos de síntesis de ésteres de esteroides en presencia de distintas ciclodextrinas y efectivamente se llegó a la conclusión de que estos compuestos podían inhibir a la enzima, los datos de los que se dispone hablarían de entorno a una inhibición del 50 y el 60% de la actividad enzimática con α - y β -ciclodextrina, respectivamente. Aunque serían necesarios más estudios parece factible usar derivados de estas que puedan causar una menor inhibición sobre la enzima y que favorecerían un aumento de su actividad como pueden ser las ciclodextrinas más hidrofóbicas (Me2 α CyD, Me2 β CyD y Me3 β CyD) (Mine *et al.*, 2003).

-Discusión-

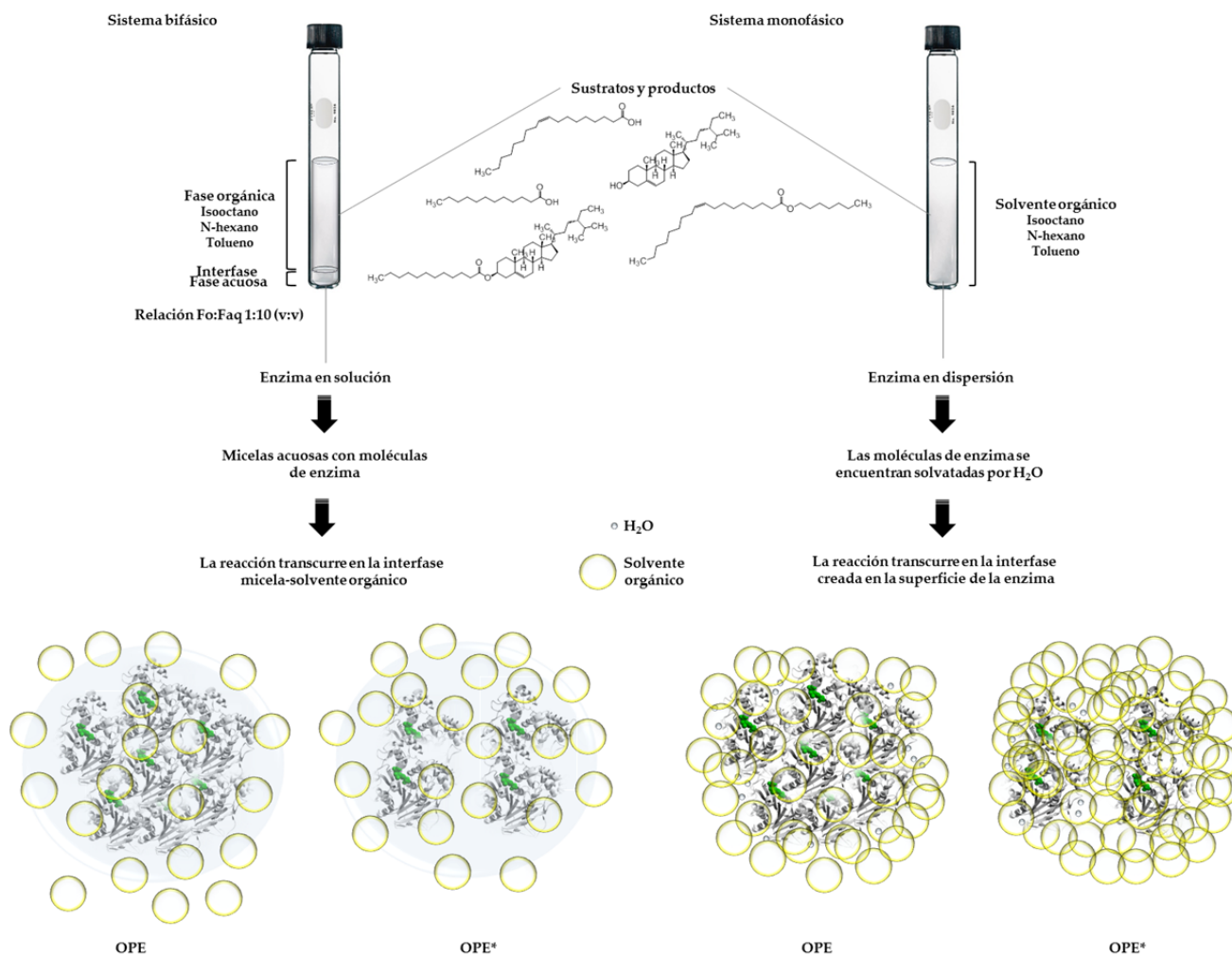


Figura 4.4. Efecto del tipo de sistema, bifásico o monofásico, sobre el estado de solvatación de las enzimas de *O. piceae*.

4.6. INGENIERÍA DE ENZIMAS: INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA

Aunque ya se ha hablado del uso de liófilos de crudos de la enzima nativa y recombinante y de su alta estabilidad parece claro que la inmovilización de la enzima deja abierta un mayor abanico de posibilidades a la hora de su aplicabilidad en continuo y reutilización (Reyes-Duarte *et al.*, 2005). De todas las estrategias existentes para la inmovilización de enzimas, la inmovilización covalente presenta la ventaja de formar uniones fuertes y estables entre la enzima y el soporte lo que resulta en un biocatalizador robusto eliminando la pérdida de actividad por fugas de la enzima (Boller *et al.*, 2002).

Los soportes epoxi-activados parecen ser sistemas casi ideales para desarrollar sistemas de inmovilización fáciles (Katchalski-Katzir, 1993). Estos soportes son muy atractivos debido a la alta densidad de grupos reactivos que presentan y la química sencilla de unión de la enzima al soporte. Los grupos epoxi son muy estables a pHs neutros incluso humedecidos y por ello los soportes comerciales se pueden almacenar durante un largo tiempo. Pueden reaccionar con diferentes grupos nucleofílicos de la superficie de la proteína (amino, hidroxilo o tiol) formando uniones fuertes (enlaces amino secundarios, enlaces tipo éter y tioéter) con una mínima modificación química de la proteína. Normalmente (a pH neutro y baja fuerza iónica) la inmovilización en estos soportes ocurre en dos etapas: i) primero la enzima se adsorbe sobre la superficie del soporte y ii) después la enzima se une covalentemente a los grupos epoxi de la superficie del soporte (Mateo *et al.*, 2003).

En la inmovilización con los soportes epoxi convencionales, como puede ser un epoxi-Sepabeads, se establece la interacción hidrofóbica entre el parche hidrofóbico de la proteína y la superficie hidrofóbica del soporte lo que rinde moderados porcentajes de inmovilización. Existen claras diferencias en las orientaciones que una enzima puede tomar en cada soporte (convencional o activado) lo que implica que ésta pueda interaccionar con aquel a través de diferentes áreas (las que tienen más residuos hidrofóbicos o las que tienen más residuos negativos) lo que puede afectar a la actividad del catalizador inmovilizado; por ejemplo, cuando la enzima de *C. rugosa* (crudo comercial de Sigma) se inmovilizó en un soporte convencional se inactivó mientras que se detectó una alta actividad recuperada en los epoxi-activados (Mateo *et al.*, 2003). Con cualquiera de los dos tipos de soporte se estabilizan a las proteínas; sin embargo con los epoxi-activados son más estables y se incrementa la vida media del inmovilizado (Mateo *et al.*, 2003)

*Dilbeads*TM es un nuevo tipo de soporte epoxi-activado basado en la combinación de tres o cuatro monómeros acrílicos. Este material es rígido y no se hincha en soluciones acuosas u orgánicas como ocurre con Eupergit C por ejemplo. Al ser epoxi-activado une a las enzimas en función del pH a través de distintos nucleófilos. En el caso de la enzima nativa de *O. piceae*, la inmovilización se llevó a cabo a elevada fuerza iónica para favorecer la unión de la enzima al soporte (Wheatley y Schmidt, 1999) y a pH 8,0 por lo que dicha unión se produjo a través de grupos amino de lisinas y tiol de las cisteínas (Martín *et al.*, 2003). *Dilbeads*TM TA presentó un volumen de poro de 1,32 cm³/g y un tamaño medio de poro de 200-1500 Å, lo que indica que la mayor parte de las biomoléculas pueden difundir por el interior del soporte lo que resulta en una mayor actividad volumétrica del biocatalizador (Janssen *et al.*, 2002). La recuperación de actividad en el soporte fue de un 20% aproximadamente, cercana a lo obtenido con otros soportes y de acuerdo a los estudios de Cao (Cao, 2006) quien vio que la actividad retenida en este tipo de soportes suele ser inferior al 40%. La pérdida de actividad puede deberse a varios factores como la orientación del sitio activo hacia la superficie, cambios conformacionales causados por la formación de las uniones covalentes o limitaciones de transporte de masas del sustrato y/o productos (Cao, 2006; Malmsten *et al.*, 1999).

En este nuevo soporte la enzima se distribuyó en los primeros 10,5 µm de la superficie del soporte lo que podría explicarse por una aparente restricción hacia el interior de las perlas del soporte motivado o bien por la tortuosidad del soporte o bien por el impedimento estérico ejercido por las moléculas de enzima inmovilizadas en la superficie.

La enzima inmovilizada mejoró sus pH y temperatura óptimos; así como su estabilidad al pH y termoestabilidad con respecto a la enzima nativa libre lo que resulta importante con vista a sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Este aumento en la estabilidad está en consonancia con los conseguidos en otros soportes relacionados (D'Annibale *et al.*, 2000; Reshmi *et al.*, 2006; Torres-Bacete *et al.*, 2001).

Con respecto a la enzima inmovilizada empaquetada a modo de biorreactor trabajando en continuo se mencionó que tras 24 horas sufría una pérdida de actividad para luego mantenerse estable, este comportamiento en dos fases es típico de enzimas covalentemente unidas al soporte y se suele atribuir a la heterogeneidad del biocatalizador inmovilizado (con moléculas de enzima que difieren en el número de uniones covalentes establecidas con el soporte y/o la orientación de su sitio activo) (Martín *et al.*, 2003).

5. CONCLUSIONES

-Esterasa versátil-

1. La selección del sistema de expresión es importante con el fin de garantizar que una proteína recombinante bioactiva se produzca con un buen rendimiento. En este contexto, *P. pastoris* es un sistema bien caracterizado, que ofrece diferentes posibilidades para la expresión y se utiliza en bioprocesos bien estudiados. Así, podría ser considerada como una biofactoría óptima para la producción de esteroles, esterasas, lipasas y esterasas. La expresión heteróloga de la esterasa de *Ophiostoma piceae* se ha conseguido de forma exitosa en la levadura metilotrófica obteniéndose niveles de actividad ocho veces mayores que los obtenidos de enzima nativa y en menos tiempo a escala de Erlenmeyer y empleando una cepa Mut⁺.
2. La producción de enzima recombinante está sujeta al pH del medio de cultivo y a la presencia en éste de determinados componentes como son el extracto de levadura y la peptona.
3. El promotor AOX1 aún estando sometido a un sistema de represión por catabolito e inducción en presencia de metanol parece tener cierta actividad basal así como que el sorbitol lo desreprime dando lugar a niveles de actividad esterasa de una 5 U/mL en las condiciones de ensayo.
4. El presente trabajo demuestra que la producción de altos niveles de la esteroles esterasa recombinante de *O. piceae* ha sido posible a través de bioprocesos operando en discontinuo y discontinuo alimentado, usando dos cepas diferentes de *P. pastoris* (Mut⁺ y Mut^s) que difieren en su capacidad para metabolizar el metanol, cultivadas en medio mínimo sintéticos.
5. El fenotipo Mut^s muestra un mejor desempeño no sólo en términos de $Y_{P/X}$, productividad volumétrica y específica que Mut⁺, sino también en términos de condiciones de operación suponiendo un ahorro en el consumo de oxígeno y una menor generación de calor.
6. La expresión de la enzima recombinante parece favorecida en la cepa Mut^s debido probablemente tanto a su propio fondo genético como al uso de sorbitol como co-sustrato. El uso de éste permitió no sólo el incremento de la tasa de crecimiento específico de Mut^s en metanol sino también, los niveles de secreción más altos de la proteína por lo que podría actuar como una chaperona química.
7. La caracterización bioquímica de la enzima recombinante muestra una enzima más glicosilada que la enzima nativa. El grado de glicosilación podría afectar positivamente a la estabilidad de la enzima recombinante frente al pH.
8. La proteína recombinante mostró diferente temperatura óptima y mejores propiedades catalíticas probablemente debido a su N-terminal modificado, que debe haber causado cambios en su hidrofobicidad, alterando su comportamiento de agregación, y afectando positivamente su eficiencia de hidrólisis para todos los sustratos ensayados.
9. Se ha demostrado el papel potencial de las enzimas de *O. piceae* para disminuir la deposición de *stickies* durante la producción de papel reciclado, basado en la hidrólisis de PVAc. El grado de conversión de este compuesto modelo en PVA fue similar al obtenido con Optizyme® 530, la enzima disponible comercialmente para esta aplicación, y mucho mejor que la alcanzada con las otras lipasas comerciales ensayadas.

-Conclusiones-

10. Ambas enzimas también son capaces de catalizar reacciones de síntesis para obtener compuestos de valor añadido, como en el caso de los ésteres de esterol para ser utilizados como aditivos en la industria alimentaria para reducir el colesterol, mejorando los resultados obtenidos con esterasas y/o lipasas comerciales en las condiciones ensayadas.
11. Las reacciones de síntesis se desarrollaron satisfactoriamente tanto en sistemas monofásicos como bifásicos, salvo en el caso de la enzima recombinante que mostró actividad casi nula en los primeros. Su estado de agregación monomérico o dimérico podría no ser tan ventajoso en estas circunstancias con respecto a los agregados macromoleculares formados por la enzima nativa y comercial.
12. El fuerte estado de agregación de la enzima nativa ha dificultado la obtención de su estructura tridimensional.
13. El soporte *Dilbeads*TM TA parece muy prometedor para la inmovilización de enzimas. La inmovilización sobre este material es rápida y fácil tanto en el laboratorio y como a escala industrial. El biocatalizador inmovilizado mejoró su estabilidad a medios alcalinos y su termoestabilidad. El uso del biocatalizador inmovilizado para la hidrólisis continua de depósitos de *pitch* en las aguas de proceso de la industria papelera es sólo un ejemplo de sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, L., Hoffman, B., Gao, Y. y Breuil, C. (1998) Action of *Ophiostoma piceae* proteinase and lipase on wood nutrients. *Canadian Journal of Microbiology* 44 [7]: 698-701.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H. y Shaw, J.F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* 43 [6]: 534-552.
- Alalouf, O., Balazs, Y., Volkinshtein, M., Grimpel, Y., Shoham, G. y Shoham, Y. (2011) A new family of carbohydrate esterases is represented by a GDSL hydrolase/acetylxytan esterase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* 286 [49]: 41993-42001.
- Allen, L.H. (1980) Mechanisms and control of pitch deposition in newsprint mills. *Tappi* 63 [2]: 81-87.
- Amann, M. y Minge, O., 2012. Biodegradability of poly(vinyl acetate) and related polymers. En "Synthetic Biodegradable Polymers" (Rieger, B., Künkel, A., Coates, G.W., Reichardt, R., Dinjus, E. y Zevaco, T.A. eds), Springer Berlin / Heidelberg, pp. 137-172.
- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J. y Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering* 6 [4]: 383-390.
- Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De Andrade, R.A., Aguiéiras, E.C.G., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V. y Freire, D.M. (2014) From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Research International* 2014 [684506].
- Arnau, C., Casas, C. y Valero, F. (2011) The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system. *Biochemical Engineering Journal* 57: 30-37.
- Arnau, C., Ramón, R., Casas, C. y Valero, F. (2010) Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology* 46 [6]: 494-500.
- Arpigny, J.L. y Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343 [1]: 177-183.
- Back, E.L. y Allen, L.H. (2000) Pitch control, wood resin and deresination, TAPPI Press (Technical Association of the Pulp & Paper Industry), Atlanta.
- Barba Cedillo, V., Martínez, M.J., Arnau, C. y Valero, F. (2014) Production of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae* in batch and fed-batch bioprocesses using different *Pichia pastoris* phenotypes as cell factory. *Biotechnology Progress* 30 [5]: 1012-1020.
- Barba Cedillo, V., Plou, F.J. y Martínez, M.J. (2012) Recombinant sterol esterase from *Ophiostoma piceae*: an improved biocatalyst expressed in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 11 [73].
- Barba Cedillo, V., Prieto Orzanco, A., Martínez Ferrer, A. T., y Martínez Hernández, M. J. (2011) Acylation procedure to obtain food and/or pharmaceutical compounds of interest using fungal sterol esterases. Patente P201131098, 1-44. Spain.
- Barba Cedillo, V., Prieto, A. y Martínez, M.J. (2013) Potential of *Ophiostoma piceae* sterol esterase for biotechnologically relevant hydrolysis reactions. *Bioengineered* 4 [4]: 249-253.
- Barral, P., Tejera, M.L., Treviño, M.Á., Batanero, E., Villalba, M., Bruix, M. y Rodríguez, R. (2004) Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen, in *Pichia pastoris* yeast: detection of partial oxidation of methionine by NMR. *Protein Expression and Purification* 37 [2]: 336-343.

-Bibliografía-

- Barrigon, J.M., Montesinos, J.L. y Valero, F. (2013) Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut(+) phenotype: methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal* 75: 47-54.
- Basheer, S. y Plat, D. (2004) Enzymatic modification of sterols using sterol-specific lipase. Patente US 2004/0105931 A1, 1-9. EEUU.
- Bateman, A., Martin, M.J., O'Donovan, C., Magrane, M., Apweiler, R., Alpi, E., Antunes, R., Arganiska, J., Bely, B., Bingley, M., Bonilla, C., Britto, R., Bursteinas, B., Chavali, G., Cibrian-Uhalte, E., Da Silva, A., De Giorgi, M., Dogan, T., Fazzini, F., Gane, P., Cas-tro, L.G., Garmiri, P., Hatton-Ellis, E., Hieta, R., Huntley, R., Legge, D., Liu, W., Luo, J., MacDougall, A., Mutowo, P., Nightin-gale, A., Orchard, S., Pichler, K., Poggioli, D., Pundir, S., Pureza, L., Qi, G., Rosanoff, S., Saidi, R., Sawford, T., Shypitsyna, A., Turner, E., Volynkin, V., Wardell, T., Watkins, X., Zellner, H., Cowley, A., Figueira, L., Li, W., McWilliam, H., Lopez, R., Xenarios, I., Bougueleret, L., Bridge, A., Poux, S., Redaschi, N., Aimo, L., Argoud-Puy, G., Auchincloss, A., Axelsen, K., Bansal, P., Baratin, D., Blatter, M.C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Boutet, E., Breuza, L., Casal-Casas, C., De Castro, E., Coudert, E., Cuche, B., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Jungo, F., Keller, G., Lara, V., Lemercier, P., Lieberherr, D., Lombardot, T., Martin, X., Masson, P., Morgat, A., Neto, T., Nospikel, N., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pozzato, M., Pruess, M., Rivoire, C., Roechert, B., Schneider, M., Sigrist, C., Sonesson, K., Staehli, S., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue, L., Veuthey, A.L., Wu, C.H., Arighi, C.N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Garavelli, J.S., Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D.A., Suzek, B.E., Vinayaka, C., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L.S., Yerramalla, M.S. y Zhang, J. (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* 43 [D1]: D204-D212.
- Beer, H.D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J.E.G., Schomburg, D. y Schmid, R.D. (1996) Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Engineering* 9 [6]: 507-517.
- Belmares, M., Blanco, M., Goddard, W.A., III, Ross, R.B., Caldwell, G., Chou, S.H., Pham, J., Olofson, P.M. y Thomas, C. (2004) Hildebrand and Hansen solubility parameters from molecular dynamics with applications to electronic nose polymer sensors. *Journal of Computational Chemistry* 25 [15]: 1814-1826.
- Benjamin, S. y Pandey, A. (1998) *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14 [12]: 1069-1087.
- Bernier, L., Breuil, C., Hintz, W.E., Horgen, P.A., Jacobi, V., Dufour, J., Aoun, M., Bouvet, G., Kim, S.H., Diguistini, S., Tanguay, P., Eades, J., Burgess, S., de la Bastide, P., Pinchback, M. y Tadesse, Y. (2004) The Canadian *Ophiostoma* genome project. *Forest Systems* 13 [1]: 105-117.
- Bezbradica, D., Mijin, D., Siler-Marinkovic, S. y Knezevic, Z. (2006) The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: a kinetic study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38 [1]: 11-16.
- Bjurlin, M.A., Bloomer, S. y Haas, M.J. (2002) Identification of carboxylesterase activities of commercial triacylglycerol hydrolase (lipase) preparations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 143-155.
- Blanchette, R.A., Farrell, R.L., Burnes, T.A., Wendler, P.A., Zimmerman, W., Brush, T.S. y Snyder, R.A. (1992) Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. *Tappi Journal* 75 [12]: 102-106.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. y Gellissen, G. (2007) Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 [3]: 513-523.

- Boller, T., Meier, C. y Menzler, S. (2002) Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Organic Process Research & Development* 6 [4]: 509-519.
- Boraston, A.B., Warren, R.A.J. y Kilburn, D.G. (2001) Glycosylation by *Pichia pastoris* decreases the affinity of a family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi*: a functional and mutational analysis. *Biochemical Journal* 358 (Pt 2): 423-430.
- Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P., Mourey, L., Andre, I., Marty, A. y Tranier, S. (2010) Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophysical Journal* 99 [7]: 2225-2234.
- Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26 [1]: 73-81.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 [1-2]: 248-254.
- Brake, A.J., 1989. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast α -factor leader. En "Yeast Genetic Engineering. Biotechnology series" pp. 269-280.
- Brenner, S. (1988) The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334 [6182]: 528-530.
- Brierley, R.A., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A. y Siegel, R.S. (1990) Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 589 [1]: 350-362.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. y Schmid, R.D. (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science* 7: 1415-1422.
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G. y Lotti, M. (2003) Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Science* 12: 2312-2319.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, W.N., Moulin, G., Bigey, F. y Dubreucq, E. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 111 [1]: 41-50.
- Brush, T.S., Chapman, R., Kurzman, R. y Williams, D.P. (1999) Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7 [10]: 2131-2138.
- Butler, M.J. y Day, A.W. (1998) Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44 [12]: 1115-1136.
- Calero-Rueda, O. (2001) Búsqueda de enzimas fúngicas con actividad esterasa para el control biológico del pitch. Tesina. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Calero-Rueda, O. (2006) Caracterización bioquímica y molecular de una esterasa fúngica. Aplicación en la industria papelera. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Prieto, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2004) Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application for pitch control in pulping of *Eucalyptus globulus* wood. *International Journal of Biotechnology* 6: 367-375.

-Bibliografía-

- Calero-Rueda, O., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2002) Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1599 [1-2]: 28-35.
- Calero-Rueda, O., Barba, V., Rodríguez, E., Plou, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) Study of a sterol esterase secreted by *Ophiostoma piceae*: sequence, model and biochemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794: 1099-1106.
- Cao, L. (2006) Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design, Wiley-VCH, Weinheim.
- Cárdenas, F., de Castro, M.S., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W. y Álvarez, E. (2001) Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 28 [2-3]: 145-154.
- Carr, P.D. y Ollis, D.L. (2009) α/β hydrolase fold: an update. *Protein and Peptide Letters* 16 [10]: 1137-1148.
- Catoni, E., Schmidt-Dannert, C., Brocca, S. y Schmid, R.D. (1997) Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties of functional expressed lipase B. *Biotechnology Techniques* 11 [9]: 689-695.
- Çelik, E., Çalik, P. y Oliver, S.G. (2009) Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast* 26 [9]: 473-484.
- Chang, S.W., Lee, G.C. y Shaw, J.F. (2006a) Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 Gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 815-822.
- Chang, S.W., Lee, G.C. y Shaw, J.F. (2006b) Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of purified enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5831-5838.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Enfors, S.O. y Veide, A. (2006) Recovery of recombinant beta-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth. *Journal of Biotechnology* 122 [1]: 86-98.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M. y Enfors, S.-O. (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27 [6]: 399-406.
- Chattopadhyay, S., Sivalingam, G. y Madras, G. (2003) Lipase specificity for the hydrolysis of poly (vinyl acetate). *Polymer Degradation and Stability* 80 [3]: 477-483.
- Chen, J.C.H., Miercke, L.J.W., Krucinski, J., Starr, J.R., Saenz, G., Wang, X., Spilburg, C.A., Lange, L.G., Ellsworth, J.L. y Stroud, R.M. (1998) Structure of bovine pancreatic cholesterol esterase at 1.6 Å: novel structural features involved in lipase activation. *Biochemistry* 37 [15]: 5107-5117.
- Chen, Y.L., Krol, J., Cino, J., Freedman, D., White, C. y Komives, E. (1996) Continuous production of thrombomodulin from a *Pichia pastoris* fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 67 [2]: 143-148.
- Chen, Z.Y., Jiao, R. y Ma, K.Y. (2008) Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 [19]: 8761-8773.

- Chepyshko, H., Lai, C.P., Huang, L.M., Liu, J.H. y Shaw, J.F. (2012) Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics* 13 [309].
- Chiou, S.Y., Lai, C.Y., Lin, L.Y. y Lin, G. (2005) Probing stereoselective inhibition of the acyl binding site of cholesterol esterase with four diastereomers of 2'-N- α -methylbenzylcarbamyl-1, 1'-bi-2-naphthol. *BMC Biochemistry* 6 [17].
- Chiruvolu, V., Eskridge, K., Cregg, J. y Meagher, M. (1998) Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75 [2-3]: 163-173.
- Clark, J.H. y Tavener, S.J. (2007) Alternative solvents: shades of green. *Organic Process Research & Development* 11 [1]: 149-155.
- Constable, D.J.C., Jiménez-González, C. y Henderson, R.K. (2007) Perspective on solvent use in the pharmaceutical industry. *Organic Process Research & Development* 11 [1]: 133-137.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L. y Valero, F. (2006a) A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering* 95 [1]: 145-154.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L. y Valero, F. (2006b) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories* 5 [17].
- Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J.L. y Valero, F. (2005) Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal* 26 [2-3]: 86-94.
- Côté, A. y Shareck, F. (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology* 42 [5]: 381-388.
- Couderc, R. y Baratti, J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 44 [10]: 2279-2289.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. y Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 9 [3]: 1316-1323.
- Cregg, J.M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. y Chappell, T., 2009. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. En "Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification" (Richard Burgess and Murray P.Deutscher eds.), Academic Press, San Diego, California, pp. 169-189.
- Cregg, J. y Madden, K.R. (1988) Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the production of foreign proteins. *Developments in Industrial Microbiology* 29: 33-41.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B. y Connerton, I.F. (2003) Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. *Protein Expression and Purification* 29: 176-184.
- Curvers, S., Brixius, P., Klauser, T., Thömmes, J., Weuster-Botz, D., Takors, R. y Wandrey, C. (2001a) Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnology Progress* 17 [3]: 495-502.

-Bibliografía-

- Curvers, S., Linnemann, J., Klauser, T., Wandrey, C. y Takors, R. (2001b) Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation-Kinetic analysis of growth and product formation. *Chemie Ingenieur Technik* 73 [12]: 1615-1621.
- Cygler, M., Schrag, J.D. y Ergun, F. (1992) Advances in structural understanding of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 10 [1]: 143-184.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. y Sermanni, G.G. (2000) Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 77 [2-3]: 265-273.
- Daly, R. y Hearn, M.T.W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18: 119-138.
- Damaso, M.C.T., Almeida, M.S., Kurtenbach, E., Martins, O.B., Pereira, N., Jr., Andrade, C.M.M.C. y Albano, R.M. (2003) Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 [10]: 6064-6072.
- Davies, J. y Jacob, F. (1968) Genetic mapping of the regulator and operator genes of the *lac* operon. *Journal of Molecular Biology* 36 [3]: 413-417.
- De Beer, Z.W., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J. (2003) The *Ophiostoma piceae* complex in the Southern Hemisphere: a phylogenetic study. *Mycological Research* 107 [4]: 469-476.
- De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y. y Callewaert, N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 27 [6]: 561-566.
- Derewenda, Z.S. y Derewenda, U. (1991) Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochemistry and Cell Biology* 69 [12]: 842-851.
- Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V. y Alcántara, A.R. (2003) Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances* 24 [2]: 180-196.
- Domínguez, A., Ferriñán, E., Sánchez, M., González, F.J., Pérez-Campo, F.M., García, S., Herrero, A.B., San Vicente, A., Cabello, J., Prado, M., Iglesias, F.J., Choupina, A., Burguillo, F.J., Fernández-Lago, L. y López, M.C. (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology* 1: 131-142.
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P. y Mattanovich, D. (2009) The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research* 8 [3]: 1380-1392.
- Eberhardt, T.L., Sheridan, P.M. y Mahfouz, J.M. (2009) Monoterpene persistence in the sapwood and heartwood of longleaf pine stumps: assessment of differences in composition and stability under field conditions. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne de Recherche Forestiere* 39 [7]: 1357-1365.
- Eggeling, L. y Sahm, H. (1978) Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5 [3]: 197-202.
- Egloff, M.P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C. y van Tilbeurgh, H. (1995) The 2.46-Angstrom resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C-11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* 34 [9]: 2751-2762.

- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 5 [5]: 1111-1121.
- Faber, K.N., Harder, W., Ab, G. y Veenhuis, M. (1995) Review: Methylophilic yeast as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1331-1344.
- Farrel, R.L., Blanchette, R.A., Brush, T.S., Hadar, Y., Iverson, S., Krisa, K., Wendler, P.A. y Zimmerman, W. (1993) Cartapip TM: a biopulping product for control of pitch and resin acid problems in pulp mills. *Journal of Biotechnology* 30: 115-122.
- Ferrer, P., Alarcón, M., Ramón, R., Benaiges, M.D. y Valero, F. (2009) Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Biochemical Engineering Journal* 46 [3]: 271-277.
- Fleet, C., Breuil, C. y Uzunovic, A. (2001) Nutrient consumption and pigmentation of deep and surface colonizing sapstaining fungi in *Pinus contorta*. *Holzforschung* 55 [4]: 340-346.
- Frikha, F., Miled, N., Bacha, A.B., Mejdoub, H. y Gargouri, Y. (2010) Structural homologies, importance for catalysis and lipid binding of the N-terminal peptide of a fungal and a pancreatic lipase. *Protein and Peptide Letters* 17 [2]: 254-259.
- Gagné, P., Yang, D.Q., Hamelin, R.C. y Bernier, L. (2001) Genetic variability of Canadian populations of the sapstain fungus *Ophiostoma piceae*. *Phytopathology* 91 [4]: 369-376.
- Gao, Y. y Breuil, C. (1995) Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus, *Ophiostoma piceae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11 [6]: 638-642.
- Gao, Y. y Breuil, C. (1998) Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 [3]: 421-429.
- Gao, Y., Breuil, C. y Chen, T. (1994) Utilization of triglycerides, fatty acids and resin acids in lodgepole pine wood by a sapstaining fungus *Ophiostoma piceae*. *Material und Organismen* 28 [2]: 105-118.
- Geigy, J.R. (1965) Tablas científicas. Documenta Geigy, Basilea, Suiza.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 741-750.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M. y van der Klei, I. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison. *FEMS Yeast Research* 5 [11]: 1079-1096.
- Goldberg, S. L., Cino, P. M., Patel, R. N., Nanduri, V. B., y Johnston, R. M. (2006) *Pichia pastoris* formate dehydrogenase and uses therefor. Bristol-Myers Squibb Company. Patente US7087418 B2. Princeton, NJ, USA.
- Görg, A., Postel, W. y Westermeier, R. (1980) Focusing, and protein mapping in polyacrylamide gels on cellophane. En "Electrophoresis '79: advanced methods, biochemical and clinical applications. Proceedings of the second international conference on electrophoresis, Munich, Germany, October 15-17, 1979" (Radola, B.J. ed.), Walter de Gruyter, Berlin.

-Bibliografía-

- Gorton, C., Kim, S.H., Henricot, B., Webber, J. y Breuil, C. (2004) Phylogenetic analysis of the bluestain fungus *Ophiostoma minus* based on partial ITS rDNA and β -tubulin gene sequences. *Mycological Research* 108 [7]: 759-765.
- Grobbelaar, J.W., Aghayeva, D.N., de Beer, Z.W., Bloomer, P., Wingfield, M.J. y Wingfield, B.D. (2009) Delimitation of *Ophiostoma quercus* and its synonyms using multiple gene phylogenies. *Mycological Progress* 8 [3]: 221-236.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D. y Cygler, M. (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science* 3 [1]: 82-91.
- Grodowska, K. y Parczewski, A. (2010) Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 67 [1]: 3-12.
- Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 [15]: 2714-2723.
- Gurramkonda, C., Adnan, A., Gäbel, T., Lünsdorf, H., Ross, A., Nemani, S.K., Swaminathan, S., Khanna, N. y Rinas, U. (2009) Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. *Microbial Cell Factories* 8 [13].
- Haridas, S., Wang, Y., Lim, L., Alamouti, S.M., Jackman, S., Docking, R., Robertson, G., Birol, I., Bohlmann, J. y Breuil, C. (2013) The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. *BMC Genomics* 14 [373].
- Harrington, T.C., Mcnew, D., Steimel, J., Hofstra, D. y Farrell, R. (2001) Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia* 93 [1]: 111-136.
- Hartner, F.S. y Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories* 5 [1]: 39.
- Hartner, F.S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S.N., Hyka, P., Lin-Cereghino, G.P., Lin-Cereghino, J., Kovar, K., Cregg, J.M. y Glieder, A. (2008) Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research* 36 [12]: e76.
- Hasan, F., Shah, A.A. y Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39 [2]: 235-251.
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C. y Ollis, D.L. (1999) Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* 7 [6]: R141-R146.
- Held, B.W., Thwaites, J.M., Farrell, R.L. y Blanchette, R.A. (2003) Albino strains of *Ophiostoma* species for biological control of sapstaining fungi. *Holzforschung* 57 [3]: 237-242.
- Henderson, R. (1970) Structure of crystalline α -chymotrypsin: IV. The structure of indoleacryloyl- α -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *Journal of Molecular Biology* 54 [2]: 341-354.
- Hermoso, J.A., Sanz-Aparicio, J., Molina, R., Juge, N., González, R. y Faulds, C.B. (2004) The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *Journal of Molecular Biology* 338 [3]: 495-506.

- Heyland, J., Fu, J., Blank, L.M. y Schmid, A. (2010) Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering* 107 [2]: 357-368.
- Higgins, D.R. y Cregg, J.M. (1998) Methods in molecular biology. *Pichia* protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hillis, W.E. (1962) Wood extractives and their significance to the pulp and paper industries, Academic Press, New York.
- Hirata, H., Higuchi, K. y Yamashina, T. (1990) Lipase-catalyzed transesterification in organic solvent: effects of water and solvent, thermal stability and some applications. *Journal of Biotechnology* 14 [2]: 157-167.
- Hol, W.G.J., van Duijnen, P.T. y Berendsen, H.J.C. (1978) The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273 [5662]: 443-446.
- Holmquist, M., Tessier, D.C. y Cygler, M. (1997) High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 11: 35-40.
- Horiguchi, H., Yurimoto, H., Goh, T.K., Nakagawa, T., Kato, N. y Sakai, Y. (2001) Peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*: transport efficiency and metabolic significance. *Journal of Bacteriology* 183 [21]: 6372-6383.
- Hoskisson, P.A. y Hobbs, G. (2005) Continuous culture - making a comeback? *Microbiology* 151: 3153-3159.
- Inan, M. (2000) Studies on the alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. Tesis doctoral. University of Nebraska, EEUU.
- Inan, M. y Meagher, M.M. (2001) Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 [6]: 585-589.
- Invitrogen™ (2002a) *Pichia* expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Version M [Catalog no. K1710-01].
- Invitrogen™ (2002b) *Pichia* fermentation process guidelines. Version B.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. y Reetz, M.T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* 53 [1]: 315-351.
- Jaeger, K.E. y Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16 [9]: 396-403.
- Jahic, M., Rotticci-Mulder, J.C., Martinelle, M., Hult, K. y Enfors, S.O. (2002) Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 [6]: 385-393.
- Jahic, M. (2003) Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. Tesis doctoral. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T. y Enfors, S.-O. (2006) Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress* 22 [6]: 1465-1473.

-Bibliografía-

- Janssen, M.H.A., van Langen, L.M., Pereira, S.R.M., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (2002) Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration. *Biotechnology and Bioengineering* 78 [4]: 425-432.
- Johnson, M.A., Waterham, H.R., Ksheminska, G.P., Fayura, L.R., Cereghino, J.L., Stasyk, O.V., Veenhuis, M., Kulachkovsky, A.R., Sibirny, A.A. y Cregg, J.M. (1999) Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics* 151 [4]: 1379-1391.
- Juge, N., Williamson, G., Puigserver, A., Cummings, N.J., Connerton, I.F. y Faulds, C.B. (2001) High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research* 1 [2]: 127-132.
- Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I.W. y von Stockar, U. (2007) A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 131 [1]: 57-66.
- Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology* 11 [11]: 471-478.
- Kazlauskas, R.J. (1994) Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in Biotechnology* 12 [11]: 464-472.
- Kim, B.H. y Akoh, C.C. (2007) Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry* 102 [1]: 336-342.
- Kim, S.H. y Breuil, C. (2001) Common nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences occur in the sibling species *Ophiostoma piceae* and *O. quercus*. *Mycological Research* 105 [3]: 331-337.
- Kirk, O. y Christensen, M.W. (2002) Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development* 6 [4]: 446-451.
- Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409 [6817]: 241-246.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M. y Tomomitsu, K. (2000) High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 [3]: 280-288.
- Kontkanen, H., Reinikainen, T. y Saloheimo, M. (2006a) Cloning and expression of a *Melanocarpus albomyces* steryl esterase gene in *Pichia pastoris* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering* 94 [3]: 407-415.
- Kontkanen, H., Saloheimo, M., Pere, J., Miettinen-Oinonen, A. y Reinikainen, T. (2006b) Characterization of *Melanocarpus albomyces* steryl esterase produced in *Trichoderma reesei* and modification of fibre products with the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 [4]: 696-704.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M. y Reinikainen, T. (2006c) Purification and characterisation of a novel steryl esterase from *Melanocarpus albomyces*. *Enzyme and Microbial Technology* 39 [2]: 265-273.
- Koutz, P., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J. y Thill, G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5 [3]: 167-177.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. y Glieder, A. (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories* 11 [1]: 22.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 [5259]: 680-685.
- Lang, D.A., Mannesse, M.L.M., De Haas, G.H., Verheij, H.M. y Dijkstra, B.W. (1998) Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *European Journal of Biochemistry* 254 [2]: 333-340.
- Lange, S., Musidlowska, A., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J. y Bornscheuer, U.T. (2001) Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase. *ChemBioChem* 2 [7-8]: 576-582.
- Larsen, M.W., Bornscheuer, U.T. y Hult, K. (2008) Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression and Purification* 62 [1]: 90-97.
- Lee, B., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2002a) Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology* 148: 2697-2704.
- Lee, G.C., Lee, L.C., Sava, V. y Shaw, J.F. (2002b) Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* lip2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. *Biochemical Journal* 366: 603-611.
- Lee, L.C., Yen, C.C., Malmis, C.C., Chen, L.F., Chen, J.C., Lee, G.C. y Shaw, J.F. (2011) Characterization of codon-optimized recombinant *Candida rugosa* lipase 5 (LIP5). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 [19]: 10693-10698.
- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O. y Schoemaker, H.E. (2009) Industrial use of enzymes. En "Physiology and maintenance" (Hänninen, O.O.P. y Atalay, M. eds), pp. 161-184.
- Leja, K. y Lewandowicz, G. (2010) Polymer biodegradation and biodegradable polymers: a review. *Polish Journal of Environmental Studies* 19 [2]: 255-266.
- Li, R., Jia, C.-S., Yue, L., Zhang, X.-M., Xia, Q.-Y., Zhao, S.-L., Feng, B., Zhong, F. y Chen, W.-J. (2010) Lipase-catalyzed synthesis of conjugated linoleyl β -sitosterol and its cholesterol-lowering properties in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 [3]: 1898-1902.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. y Wang, X. (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2 [3].
- Lin, G., Shieh, C.-T., Tsai, Y.-C., Hwang, C.-I., Lu, C.-P. y Chen, G.-H. (1999) Structure-reactivity probes for active site shapes of cholesterol esterase by carbamate inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1431 [2]: 500-511.
- Lin-Cereghino, G.P., Godfrey, L., de la Cruz, B.J., Johnson, S., Khuongsathiene, S., Tolstorukov, I., Yan, M.D., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S. y Cregg, J.M. (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 26 [3]: 883-897.
- Lin-Cereghino, G.P., Lin-Cereghino, J., Ilgen, C. y Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 13 [4]: 329-332.
- Lin-Cereghino, G.P., Sunga, A.J., Lin-Cereghino, J. y Cregg, J.M. (2001) Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. En "Genetic engineering: principles and methods" (Setlow, J. ed.), Springer US, pp. 157-169.
- Lin-Cereghino, J. y Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24 [1]: 45-66.

-Bibliografía-

- Linnakoski, R., de Beer, Z., Niemela, P. y Wingfield, M.J. (2012) Associations of conifer-infesting bark beetles and fungi in Fennoscandia. *Insects* 3 [1]: 200-227.
- Liou, Y.C., Marangoni, A.G. y Yada, R.Y. (1998) Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Research International* 31 [3]: 243-248.
- Lobley, A., Whitmore, L. y Wallace, B.A. (2002) Dichroweb: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18 [1]: 211-212.
- López, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F. y Rúa, M.L. (2004) Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnology Progress* 20 [1]: 65-73.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J.L., Brocca, S., Valero, F. y Lafuente, J. (1998) Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids* 93: 143-148.
- Lotti, M. y Alberghina, L., 2007. Lipases: molecular structure and function. En "Industrial Enzymes: structure, function and applications" (Polaina, J. y MacCabe, A.P. eds), Springer Netherlands, pp. 263-281.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. y Harvey, L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249-270.
- Maeda, A., Mizuno, T., Bunya, M., Sugihara, S., Nakayama, D., Tsunasawa, S., Hirota, Y. y Sugihara, A. (2008) Characterization of novel cholesterol esterase from *Trichoderma* sp AS59 with high ability to synthesize sterol esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 [4]: 341-349.
- Malmsten, M., Xing, K.Z. y Ljunglöf, A. (1999) Confocal microscopy studies of trypsin immobilization on porous glycidyl methacrylate beads. *Journal of Colloid and Interface Science* 220 [2]: 436-442.
- Mancheño, J.M., Pernas, M.A., Martínez, M.J., Ochoa, B., Rúa, M.L. y Hermoso, J.A. (2003) Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 332: 1059-1069.
- Mandrich, L., Merone, L., Pezzullo, M., Cipolla, L., Nicotra, F., Rossi, M. y Manco, G. (2005) Role of the N-terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family. *Journal of Molecular Biology* 345 [3]: 501-512.
- Marchot, P. y Chatonnet, A. (2012) Enzymatic activity and protein interactions in alpha/beta hydrolase fold proteins: moonlighting versus promiscuity. *Protein and Peptide Letters* 19 [2]: 132-143.
- Martín, M.T., Plou, F.J., Alcalde, M. y Ballesteros, A. (2003) Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 21 [4-6]: 299-308.
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisán, J.M. y Fernández-Lafuente, R. (2003) Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4 [3]: 772-777.
- Mine, Y., Fukunaga, K., Itoh, K., Yoshimoto, M., Nakao, K. y Sugimura, Y. (2003) Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 [5]: 441-447.

- Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Sola, C., Schmid, R.D. y Valero, F. (2001) Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 86 [1]: 59-70.
- Miranda, R., Balea, A., de la Blanca, E.S., Carrillo, I. y Blanco, A. (2008) Identification of recalcitrant stickies and their sources in newsprint production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47 [16]: 6239-6250.
- Mølgaard, A., Kauppinen, S. y Larsen, S. (2000) Rhamnogalacturonan acetylesterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* 8 [4]: 373-383.
- Mukherjee, K.D., 2002. Plant lipases as biocatalysts. En "Lipid Biotechnology" (Kuo, T.M. y Gardner, H. eds), CRC Press, 2002, pp. 399-416.
- Nardini, M. y Dijkstra, B.W. (1999) α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* 9 [6]: 732-737.
- Niu, W., Li, Z. y Tan, T. (2006) Secretion of pro- and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins. *Molecular Biotechnology* 32 [1]: 73-81.
- Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R. y Frenken, L.G.J. (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Letters* 331 [1-2]: 123-128.
- Norin, M., Haefner, F., Achour, A., Norin, T. y Hult, K. (1994) Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Science* 3 [9]: 1493-1503.
- Norinobu, S., Seo, N., Sato, F., Kaneko, S., y Mankura, M. (2003) Process for producing dietary sterol fatty acid esters. Patente US 6.660.491 B2, 1-22.United States.
- Novozymes (2012) The Novozymes report 2012. Bedingfield, J. ed. Denmark, Novozymes A/S.
- Novozymes (2014) The Novozymes report 2014. Winther, A. B. ed. CVR No.: 10007127. Denmark, Novozymes A/S.
- Ohi, H., Miura, M., Hiramatsu, R. y Ohmura, T. (1994) The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris aox2* gene. *Molecular & General Genetics* 243 [5]: 489-499.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G. y Goldman, A. (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5 [3]: 197-211.
- Pahoja, V.M. y Sethar, M.A. (2002) A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan Journal of Applied Sciences* 2 [4]: 474-484.
- Palomo, J.M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisán, J.M. y Fernández-Lafuente, R. (2003) General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4 [1]: 1-6.
- Panke, S. y Wubbolts, M.G. (2002) Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 13 [2]: 111-116.
- Paulin-Mahady, A.E., Harrington, T.C. y McNew, D. (2002) Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia* 94 [1]: 62-72.

-Bibliografía-

- Peña-Montes, C., Lange, S., Castro-Ochoa, D., Ruiz-Noria, K., Cruz-García, F., Schmid, R., Navarro-Ocaña, A. y Farrés, A. (2009) Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 [3-4]: 225-234.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M. y Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20 [18]: 3551-3567.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P. y Petersen, S.B. (2001) How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology* 85 [2]: 115-147.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8 [10]: 785-786.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A. y Crous, P.W. (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 21 [1]: 29-55.
- Plat, J. y Mensink, R.P. (2005) Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *The American Journal of Cardiology* 96 [1]: 15-22.
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C. y Schmid, R.D. (2000) Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 [5]: 491-508.
- Pleiss, J., Fischer, M. y Schmid, R.D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93 [1-2]: 67-80.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. y Mattanovich, D. (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology* 31 [3]: 245-259.
- Potvin, G., Ahmad, A. y Zhang, Z. (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochemical Engineering Journal* 64: 91-105.
- Prasad, S., Khadatare, P.B. y Roy, I. (2011) Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 77 [13]: 4603-4609.
- Ramón Real, R. (2007) Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*: aplicació de tècniques de monitorització i control. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
- Ramón, R., Ferrer, P. y Valero, F. (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 130 [1]: 39-46.
- Ranaldi, S., Belle, V., Woudstra, M., Bourgeas, R., Guigliarelli, B., Roche, P., Vezin, H., Carriere, F. y Fournel, A. (2010) Amplitude of pancreatic lipase lid opening in solution and identification of spin label conformational subensembles by combining continuous wave and pulsed EPR spectroscopy and molecular dynamics. *Biochemistry* 49 [10]: 2140-2149.
- Rehm, S., Trodler, P. y Pleiss, J. (2010) Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein Science* 19 [11]: 2122-2130.
- Ren, H.T., Yuan, J.Q. y Bellgardt, K.-H. (2003) Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *Journal of Biotechnology* 106 [1]: 53-68.

- Reshmi, R., Sanjay, G. y Sugunan, S. (2006) Enhanced activity and stability of alpha-amylase immobilized on alumina. *Catalysis Communications* 7 [7]: 460-465.
- Reyes-Duarte, D., López-Cortés, N., Ferrer, M., Plou, F.J. y Ballesteros, A. (2005) Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. *Biocatalysis and Biotransformation* 23 [1]: 19-27.
- Roets, F., de Beer, Z.W., Dreyer, L.L., Zipfel, R., Crous, P.W. y Wingfield, M.J. (2006) Multi-gene phylogeny for *Ophiostoma* spp. reveals two new species from *Protea* infructescences. *Studies in Mycology* 55 [1]: 199-212.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. y Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8 [6]: 423-488.
- Romón, P., Zhou, X., Iturrondobeitia, J.C., Wingfield, M.J. y Goldarazena, A. (2007) *Ophiostoma* species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Canadian Journal of Microbiology* 53 [6]: 756-767.
- Rosenfeld, S. A. (1999) Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. Methods in Enzymology. Expression of Recombinant Genes in Eukaryotic Systems. Volume 306 [Chapter 9], 154-169. San Diego, California, Academic Press.
- Roy, A., Kucukural, A. y Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5 [4]: 725-738.
- Rúa, M.L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. y Schmid, R.D. (1997) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology* 56 [2]: 89-102.
- Ryu, J.Y., Song, B.K. y Song, J.K. (2008) Application of lipase to reduce ONP flotation rejects. Part 1. Changes in hydrophobicity. *Tappi Journal* 7 [6]: 15-20.
- Sakai, Y., Yurimoto, H., Matsuo, H. y Kato, N. (1998) Regulation of peroxisomal proteins and organelle proliferation by multiple carbon sources in the methylotrophic yeast, *Candida boidinii*. *Yeast* 14 [13]: 1175-1187.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Pernas, M.A., Valero, F., Rúa, M.L., Casas, C. y Solá, C. (1999) Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 25 [3-5]: 214-223.
- Sánchez-Montero, J.M., Hamon, V., Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) Modulation of lipase hydrolysis and synthesis reactions using carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1078 [3]: 345-350.
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. y Gulati, R. (1999) Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77 [1]: 101-115.
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ali, Y.B., Verger, R. y Gargouri, Y. (2005) N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters* 579 [5]: 976-982.
- Schmid, R.D. y Verger, R. (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition* 37 [12]: 1608-1633.

-Bibliografía-

- Schmidt-Dannert, C. (1999) Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7: 2123-2130.
- Schrag, J.D. y Cygler, M. (1997) Lipases and α/β hydrolase fold. En "Methods in enzymology. Lipases, part A: biotechnology" (Byron Rubin, E.A.D. ed.), Academic Press, Nueva York, pp. 85-107.
- Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S. y Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351 [6329]: 761-764.
- Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L. y Kasturi, L. (1996) The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 271 [11]: 6363-6366.
- Shapiro, R.I., Wen, D., Levesque, M., Hronowski, X., Gill, A., Garber, E.A., Galdes, A., Strauch, K.L. y Taylor, F.R. (2003) Expression of Sonic hedgehog-Fc fusion protein in *Pichia pastoris*. Identification and control of post-translational, chemical, and proteolytic modifications. *Protein Expression and Purification* 29 [2]: 272-283.
- Shuler, M.L. y Kargi, F., 2002. Recovery and purification of products. En "Bioprocess engineering. Basic concepts" (Shuler, M.L. y Kargi, F. eds), Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 329-384.
- Sivalingam, G., Chattopadhyay, S. y Madras, G. (2003) Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone), poly (vinyl acetate) and their blends by lipases. *Chemical Engineering Science* 58 [13]: 2911-2919.
- Six, D.L. y Wingfield, M.J. (2011) The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology* 56 [1]: 255-272.
- Somogyi, M. (1945) A new reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry* 160 [1]: 61-68.
- Song, H.T., Jiang, Z.B. y Ma, L.X. (2006) Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. *Protein Expression and Purification* 47 [2]: 393-397.
- Speranza, M., Ibarra, D., Romero, J., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Camarero, S. (2007) Microscopy studies reveal delignification and sterol removal from eucalypt kraft pulps by laccase-HBT. *Biocatalysis and Biotransformation* 25 [2-4]: 251-259.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. y Birkenberger, L.A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190 [1]: 55-62.
- Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M., Maurer, M., Sauer, M., Mattanovich, D. y Gasser, B. (2010) Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *Journal of Biotechnology* 150 [4]: 519-529.
- Staley, C.A., Huang, A., Nattestad, M., Oshiro, K.T., Ray, L.E., Mulye, T., Li, Z.H., Le, T., Stephens, J.J., Gomez, S.R., Moy, A.D., Nguyen, J.C., Franz, A.H., Lin-Cereghino, J. y Lin-Cereghino, G.P. (2012) Analysis of the 5'untranslated region (5'UTR) of the alcohol oxidase 1 (AOX1) gene in recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 496 [2]: 118-127.
- Stewart, D. J., Milanova, R., Zawistowski, J. y Wallis, S. H. (2000) Phytosterol compositions and use thereof in foods, beverages, pharmaceuticals, nutraceuticals and the like. Patente US 6.087.353, pp. 1-9. EEUU.
- Stratton, J., Chiruvolu, V. y Meagher, M. (1998) High cell-density fermentation. En "*Pichia* protocols" (Higgins, D.R. y Cregg, J.M. eds), Humana Press, pp. 107-120.

- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. y Holle, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 [7]: 952-965.
- Suplatov, D.A., Besenmatter, W., Švedas, V.K. y Svendsen, A. (2012) Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Engineering Design and Selection* 25 [11]: 689-697.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R. y Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 98 [1]: 231-237.
- Sydow, H. y Sydow, P. (1919) Über einige neu zu benennende Gattungen. *Annales Mycologici* 17 [1]: 43.
- Szejtli, J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* 98 [5]: 1743-1753.
- Tang, S.J., Shaw, J.F., Sun, K.H., Sun, G.H., Chang, T.Y., Lin, C.K., Lo, Y.C. y Lee, G.C. (2001) Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* LIP4 lipase in *Pichia pastoris*: comparison of glycosylation, activity, and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387 [1]: 93-98.
- Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C. y Crespo, J.G. (2011) Production of steryl esters from vegetable oil deodorizer distillates by enzymatic esterification. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 50 [5]: 2865-2875.
- Tenkanen, M., Kontkanen, H., Isoniemi, R., Spetz, P. y Holmbom, B. (2002) Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 [1]: 120-127.
- Thompson, G.R. y Grundy, S.M. (2005) History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *The American Journal of Cardiology* 96 [1]: 3-9.
- Thorpe, E.D., d'Anjou, M.C. y Daugulis, A.J. (1999) Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* 21 [8]: 669-672.
- Todd, A.E., Orengo, C.A. y Thornton, J.M. (2002) Plasticity of enzyme active sites. *Trends in Biochemical Sciences* 27 [8]: 419-426.
- Töke, E.R., Nagy, V., Recseg, K., Szakács, G. y Poppe, L. (2007) Production and application of novel sterol esterases from *Aspergillus* strains by solid state fermentation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84 [10]: 907-915.
- Tolner, B., Smith, L., Begent, R.H.J. y Chester, K.A. (2006) Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nature Protocols* 1 [2]: 1006-1021.
- Torres, P., Datla, A., Rajasekar, V.W., Zambre, S., Ashar, T., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Calero-Rueda, O., Barba, V., Martı́nez, M.J., Ballesteros, A. y Plou, F.J. (2008) Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads™). *Catalysis Communications* 9 [4]: 539-545.
- Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres-Guzmán, R., de la Mata, I., Castellón, M.P. y Acebal, C. (2001) Stabilization of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae* by covalent immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76 [5]: 525-528.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M. y Oliveira, J.V. (2010) A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology* 3 [2]: 182-196.

-Bibliografía-

- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. y Gingeras, T.R. (1987) Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research* 15 [9]: 3859-3876.
- U.S.Congress, Office of Technology Assessment (1988) New developments in *biotechnology*: U.S. investment in biotechnology-Special report, OTA-BA-360. U.S.Government Printing Office. 1-296. Washington, DC.
- Ullmann, A., Jacob, F. y Monod, J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the *b^l*-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 24 [2]: 339-343.
- Upton, C. y Buckley, J.T. (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends in Biochemical Sciences* 20 [5]: 178-179.
- van Beilen, J.B. y Li, Z. (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13 [4]: 338-344.
- Villeneuve, P., Turon, F., Caro, Y., Escoffier, R., Baréa, B., Barouh, B., Lago, R., Piombo, G. y Pina, M. (2005) Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. *Enzyme and Microbial Technology* 37 [1]: 150-155.
- Villeneuve, P. (2003) Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105 [6]: 308-317.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J. y Haas, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9 [4-6]: 113-148.
- Visser, H., Joosten, V., Punt, P.J., Gusakov, A.V., Olson, P.T., Joosten, R., Bartels, J., Visser, J., Sinitsyn, A.P., Emalfarb, M.A., Verdoes, J.C. y Wery, J. (2011) Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. *Industrial Biotechnology* 7 [3]: 214-223.
- Vu, P.-L., Shin, J.-A., Lim, C.-H. y Lee, K.-T. (2004) Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. *Food Research International* 37 [2]: 175-180.
- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramic', M., Zou, P., Lešćic', I., Franke, P. y Pigac, J. (2002) A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Archives of Microbiology* 178 [2]: 124-130.
- Walsh, C. (1979). Enzymatic reactions mechanisms. W. H. Freeman & Company, San Francisco, EEUU.
- Wang, Z., Chen, T., Gao, Y., Breuil, C. y Hiratsuka, Y. (1995) Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 61 [1]: 222-225.
- Weber, N., Weitkamp, P. y Mukherjee, K.D. (2002) Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Research International* 35 [2-3]: 177-181.
- Wegner, G.H. y Harder, W. (1987) Methylophilic yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 53 [1]: 29-36.
- Wei, D., Zhang, L.Y. y Song, Q. (2004) Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *Candida rugosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 133-136.

- Weidner, M., Taupp, M. y Hallam, S.J. (2010) Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Visualized Experiments* 36: e1862.
- Wheatley, J.B. y Schmidt, D.E. (1999) Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *Journal of Chromatography A* 849 [1]: 1-12.
- Whitmore, L. y Wallace, B.A. (2004) Dichroweb, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32 [2]: W668-W673.
- Whyteside, G., Nor, R.M., Alcocer, M.J.C. y Archer, D.B. (2011) Activation of the unfolded protein response in *Pichia pastoris* requires splicing of a *HAC1* mRNA intron and retention of the C-terminal tail of Hac1p. *FEBS Letters* 585 [7]: 1037-1041.
- Xiang, H., Masuo, S., Hoshino, T. y Takaya, N. (2007) Novel family of cholesterol esterases produced by actinomycetes bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1774 [1]: 112-120.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. y Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12 [1]: 7-8.
- Yang, J. y Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* 43 [W1]: W174-W181.
- Yen, C.C., Malmis, C.C., Lee, G.C., Lee, L.C. y Shaw, J.F. (2010) Site-specific saturation mutagenesis on residues 132 and 450 of *Candida rugosa* LIP2 enhances catalytic efficiency and alters substrate specificity in various chain lengths of triglycerides and esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 [20]: 10899-10905.
- Yu, X.W., Wang, L.L. y Xu, Y. (2009) *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 [1-4]: 304-311.
- Zaks, A. y Klivanov, A.M. (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 [10]: 3192-3196.
- Zhang, W.H., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A. y Meagher, M.M. (2000) Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering* 70 [1]: 1-8.
- Zhang, W., Inan, M. y Meagher, M.M. (2007). Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations. En "*Pichia* protocols. Methods in Molecular Biology" (Cregg, J.M. ed.), Humana Press, pp. 43-63.
- Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9 [40].
- Zink, P. y Fengel, D. (1988) Studies on the coloring matter of blue-stain fungi. Part I. General characterization and the associated compounds. *Holzforschung* 42 [4]: 217-220.
- Zipfel, R.D., de Beer, Z.W., Jacobs, K., Wingfield, B.D. y Wingfield, M.J. (2006) Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55 [1]: 75-97.

7. ANEXO

El presente trabajo de investigación ha dado lugar a las siguientes publicaciones, patentes y comunicaciones en congresos:

I) Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis doctoral

1. Torres, P., Datla, A., Rajasekar, V.W., Zambre, S., Ashar, T., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Calero-Rueda, O., Barba, V., Martínez, M.J., Ballesteros, A. y Plou, F.J. (2008). Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads™). *Catalysis Communications*, 9, 539-545.
2. Calero-Rueda, O., Barba, V., Rodríguez, E., Plou, F.J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009). Study of a sterol esterase secreted by *Ophiostoma piceae*: sequence, model and biochemical properties. *BBA - Proteins and Proteomics*, **1794** (7), 1099-1106.
3. Barba, V., Plou, F.J., Calero-Rueda, O., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009). Native and recombinant sterol esterases from *Ophiostoma piceae*: enzymes with high biotechnological potential. *New Biotechnology*, 25 (1), S136.
4. Barba Cedillo, V., Plou, F.J. y Martínez, M.J. (2012). Recombinant sterol esterase from *Ophiostoma piceae*: an improved biocatalyst expressed in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 11:73.
5. Barba Cedillo, V., Prieto, A. y Martínez, M.J. (2013). Potential of *Ophiostoma piceae* sterol esterase for biotechnologically relevant hydrolysis reactions. *Bioengineered*, 4 (4), 1-5.
6. Barba Cedillo, V., Arnau, C., Martínez, M.J. y Valero, F. (2014). Production of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae* in batch and fed-batch bioprocesses using different *Pichia pastoris* phenotypes as cell factory. *Biotechnology Progress*, 30 (5), 1012-1020.

II) Publicaciones científicas no relacionadas con esta tesis doctoral

1. Amairi, H., Barba, V., de los ríos, V., Ouzari, H.I., Jaouani, A. y Martínez, M.J. (2011). Isolation and characterization of a new dimeric esterase from *Lactobacillus sakei* 23K. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112 (6), 558-560.

III) Patentes

1. Barba Cedillo, V., Prieto Orzanco, A., Martínez Ferrer, A.T. y Martínez Hernández, M.J. *Procedimiento de acilación para la obtención de compuestos de interés alimenticio y/o farmacéutico utilizando esterol esterases fúngicas*. P201131098 junio 2011, PCT/ES2012/070473 junio 2012, WO 2013/001126.

IV) Comunicaciones presentadas en congresos

1. Barba, V. (2005). Expresión heteróloga de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en *Pichia pastoris*. En *I reunión de la Red Española de Biología molecular y Genética de Hongos filamentosos (Red Micelio)*. Baeza (Jaén), 14-16 de junio. Comunicación oral. Red Nacional.
2. Barba, V., Calero-Rueda, O., Rodríguez, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2005). Control biológico del *pitch* de eucalipto: Optimización/alternativas para la producción de la esterasa de *Ophiostoma piceae*. En *XX Congreso Nacional de Microbiología de la SEM*. Cáceres, 19-22 de septiembre. Póster I-271 seleccionado para presentación oral. Congreso Nacional.
3. Torres, P., Barba, V., Calero-Rueda, O., Rajasekar, V.W., Plou, F.J., Martínez, M.J. y Ballesteros, A. (2006). Covalent immobilization of a fungal esterase, with high activity on triglycerides and sterol esters, on Dilbeads®. En *International Symposium on Environmental Biocatalysis. From remediation with enzymes to novel green processes*. Organizado por la ESAB (sección de biocatálisis aplicada de la EFB). Córdoba (España), 23-26 de abril. Póster P-55. Congreso internacional.
4. Barba, V., Calero-Rueda, O., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2006). *Pitch* biocontrol: heterologous expression of *Ophiostoma piceae* esterase in *Pichia pastoris*. En *2nd FEMS Congress of European Microbiologists*. Madrid, 4-8 de julio. Póster P. BIM. 12. Congreso internacional.
5. Martínez, A.T., Camarero, S., Ibarra, D., Calero-Rueda, O., Barba, V., Martínez, M.J., Speranza, M., Romero, J., Gutiérrez, A., Rencoret, J. y del Río, J.C. (2006). Fungal Biotechnology for the Paper Industry. En *2nd FEMS Congress of European Microbiologists*. Madrid, 4-8 de julio. Comunicación oral. Congreso internacional.
6. Barba, V. (2006). Expresión heteróloga de una esterasa fúngica con interés biotecnológico en *Pichia pastoris*. En *II Reunión de la Red Española de Genética y Biología Molecular de Hongos Filamentosos (Red Micelio)*. Peñaranda de Duero, Burgos; 11-14 de julio. Comunicación oral. Red nacional.
7. Torres, P., Barba, V., Calero-Rueda, O., Rajasekar, V.W., Plou, F.J., Martínez, M.J. y Ballesteros, A. (2006). Inmovilización covalente de una esterase de *Ophiostoma piceae* en Dilbeads. En *Biospain. Biotech*. Organizado por la SEBiot (Sociedad Española de Biotecnología). Madrid, 18-20 de septiembre. Póster P.BAP. 1.15. Congreso internacional.
8. Torres, P., Barba, V., Calero-Rueda, O., Rajasekar, V.W., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J., Martínez, M.J. y Ballesteros, A. (2007). Caracterización mediante microscopía confocal y porosimetría de una esterasa inmovilizada en soportes poliméricos epoxi-activados. En *Catálisis y Procesos Catalíticos: tendencias y perspectivas para un desarrollo sostenible. Libro de Actas de la Reunión de la Sociedad Española de Catálisis SECAT'07*. Bilbao, 26-29 de junio. Comunicación oral O-65. Congreso nacional.
9. Barba, V., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2007). Novel fungal esterase of biotechnological interest: study and properties of the recombinant enzyme. En *13th European Congress on Biotechnology, Symbiosis*. Organizado por la EFB (European Federation of Biotechnology) Barcelona, 16-19 de septiembre. Póster 299. Congreso internacional.
10. Barba, V. (2008). Estudios sobre una esterasa fúngica con interés biotecnológico. En *III Reunión de la Red Española de Genética y Biología Molecular de Hongos Filamentosos (Red Micelio)*. Donostia-San Sebastián, Guipúzcoa; 15-17 de julio. Comunicación oral. Red nacional.
11. Barba, V., Arnau, C., Valero, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2008). Escalado en la producción de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en *Pichia pastoris* y su potencial biotecnológico en la industria

- papelera. En CMIBM 2008. VI Reunión del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM. Barcelona, 12-14 de noviembre. Póster 6. Congreso nacional.
12. Barba, V., Calero-Rueda, O., Plou, F.J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009). Esterol esterasa de *Ophiostoma piceae*: caracterización molecular, expresión heteróloga y aplicaciones biotecnológicas. En XII Reunión de la Red Temática Biotecnología de Materiales Lignocelulósicos: retos moleculares, enzimáticos y químicos para su aplicación industrial y medioambiental. Alcalá de Henares, Madrid; 4-5 de junio. Comunicación oral. Red nacional.
 13. Barba, V., Plou, F.J., Calero-Rueda, O., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009). Native and recombinant sterol esterases from *Ophiostoma piceae*: enzymes with high biotechnological potential. En 14th European Congress on Biotechnology, Symbiosis. Organizado por la EFB. Barcelona, 13-16 de septiembre. Póster 2.3.069. Congreso internacional.
 14. Barba, V., Plou, F.J., Arnau, C., Valero, F., Prieto, A., Calero-Rueda, O., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009). Esterol esterasa de *Ophiostoma piceae*: una enzima muy versátil con alto potencial biotecnológico. En XXII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM. Almería, 21-24 de septiembre. Póster P.163. Comunicación oral CO.4B.1. Congreso nacional.
 15. Barba, V., Plou, F.J., Arnau, C., Valero, F., Prieto, A., Calero-Rueda, O., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2010). Sterol esterase from *Ophiostoma piceae*: a new promising biocatalyst for biomass exploitation. En Lignobiotech One Symposium. Organizado por el INRA y la Universidad de Reims, Reims, Francia, 28 marzo-1 abril. Póster. Congreso internacional.
 16. Barba, V., Prieto, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2010). Fungal sterol esterases: versatile biocatalysts for different biotechnological applications. En Biotec 2010, 5th International Meeting on Biotechnology. Organizado por la SEBiot. Pamplona, 29 septiembre-1 octubre. Póster S-11. OC1. Comunicación oral S-11. OC1. Congreso internacional.
 17. Barba Cedillo, V., Prieto, A., y Martínez, M.J. (2010). Síntesis de nutraceuticos mediada por esterol esterases. En CMIBM2010. III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología microbiana de la SEM. Alcalá de Henares, Madrid, 17-19 de noviembre. Póster B.F. P.12. Congreso nacional.
 18. Barba, V., Prieto, A., Martínez, A.T., y Martínez, M.J. (2011). Esterol esterases fúngicas: catalizadores versátiles para diferentes aplicaciones de la biomasa. En XIV Reunión de la Red Temática Biotecnología de Materiales Lignocelulósicos: retos moleculares, enzimáticos y químicos para su aplicación industrial y medioambiental. CIEMAT, Madrid; 5-6 de septiembre. Comunicación oral. Red nacional.
 19. Barba, V., Prieto, A., y Martínez, M.J. (2011). Fungal sterol esterases as biocatalysts for degradation or synthesis reactions. En Italic 6, Italian meeting on lignocellulosic chemistry. COST FP0602. Organizado por las universidades de Tuscia y Tor Vergata. Viterbo, Italia, 5-8 de septiembre. Póster 1. Congreso internacional.
 20. Barba Cedillo, V., Plou, F.J. y Martínez, M.J. (2011). Improvement of the kinetic parameters and solubility of the *Ophiostoma piceae* sterol esterase expressed in *Pichia pastoris*. En Workshop on Hydrodynamic and thermodynamic analysis of biological macromolecules with Sedfit and Sedphat. Organizado por CIB-CSIC y Nanolytics. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, Madrid, 19-23 de septiembre. Póster. Workshop internacional.
 21. Barba Cedillo, V., Prieto, A. y Martínez, M.J. (2011). Enzymatic production of added value compounds from lignocellulosic lipophilic extractives. En 6th European Symposium on Enzymes in

Grain Processing. Organizado por la DTU y el Calsberg Laboratorium. Carlsberg Research Center, Copenhagen, Denmark, 28-30 de noviembre. Póster PP1. Congreso internacional.

22. Vaquero, M.E., Barba, V., Medrano, F.J., Barriuso, J. y Martínez, M.J. (2012). N-terminal modifications of recombinant sterol esterase from *Ophiostoma piceae* increase its solubility. En *Biotec 2012, 6th Congress on Biotechnology*. Organizado por la SEBiot. Bilbao, 19-21 septiembre. Póster MB-11. Congreso internacional.
23. Martín, J., Prieto, A., Barba, V., Gómez, B.J. y Martínez, M.J. (2012). Highly efficient synthesis of sitostanol esters catalyzed by the *Ophiostoma piceae* sterol esterase. En *Biotec 2012, 6th Congress on Biotechnology*. Organizado por la SEBiot. Bilbao, 19-21 septiembre. Póster MB-15. Congreso internacional.
24. Barriuso, J., Vaquero, M.E., Barba, V., Prieto, A. y Martínez, M.J. (2012). Expresión de una esterol esterasa fúngica en diferentes hospedadores heterólogos: solubilidad y estado de agregación. En *XV Reunión de la Red Temática Española Lignocel. Biotecnología de Materiales Lignocelulósicos: retos moleculares, enzimáticos y químicos para su aplicación industrial, energética y medioambiental*. Salamanca, 13-14 de noviembre. Comunicación oral SC09-17. Red nacional.
25. Gómez, B.J., Prieto, A., Barba, V., Martín, J. y Martínez, M.J. (2012). Interesterificación de trioleína para la producción de biodiesel, catalizada por la esterol esterasa de *Ophiostoma piceae*. En *CMIBM2012. IV Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM*. Salamanca, 14-16 de noviembre. Póster B.B.3. Congreso nacional.

